

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
ÚSTAV PRO ŽIVOTNÍ PROSTŘEDÍ

Ochrana životního prostředí

Ekologie a ochrana prostředí



Bc. Daniela Polanská

Využití tkáňových linií pro toxikologii v životním prostředí

Utilization of tissue cultures for toxicology of the environment

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Tomáš Cajthaml, PhD.

Praha, 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 3. ledna 2020

.....
Bc. Daniela Polanská

Poděkování

Děkuji vedoucímu této práce prof. RNDr. Tomáši Cajthamlovi, PhD. za vědecký dohled nad zpracováním tématu a za cenné rady. Dále děkuji konzultantovi RNDr. Jaroslavovi Semerádovi, PhD. za trpělivost a připomínky při zpracování experimentální části, Mgr. Lucii Linhartové za čas, který mi věnovala při zaučení v laboratoři a Mgr. Simoně Šilhavécké za ochotu pomoci a přátelské jednání.

Rovněž děkuji rodině a příteli za podporu při studiu, bez jejichž pomoci by tato práce nemohla vzniknout.

Abstrakt

Pět látek ze skupiny látek tzv. produktů osobní hygieny, které jsou známé svou obtížnou degradabilitou a běžnou detekcí v životním prostředí, bylo testováno z hlediska toxicity pomocí dvou rybích tkáňových liniích (RTgill-W1 a RTG-2) izolovaných ze pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*). Testovanými látkami byli hexadecylpyridinium chlorid (HDP), chlorhexidin (CHX), octenidin (OCT), thymol (THM) a triclosan (TCS),

S každou z těchto látek byl proveden test na viabilitu buněk s použitím protokolů Alamar Blue™ (AB), 5-karboxyfluorescein diacetát acetoxyethyl ester (CFDA-AM) a neutral red (NR). Výsledky byly použity pro konstrukci křivek dávka-odpověď spolu s hodnotou EC₅₀ pro každou z těchto látek. Hodnoty EC₅₀ se pohybovaly u RTgill-W1 od 0,51 (HDP) do 33,75 µg.ml⁻¹ (THM) a u RTG-2 od 0,31 (HDP) do 33,37 µg.ml⁻¹ (THM). Byl zpracován i teoretický odhad LC₅₀ podle Tanneberger et al. (2013). U všech látek byla sledována aktivita cytochromu P450 1A pomocí 7-ethoxyresorufin-o-deethylázy (EROD), z čehož čtyři se statisticky prokázaly jako tzv. EROD pozitivní, nejvyšší odezva EROD byla naměřena u nejtoxičtější z chemikálií - HDP. Jediný TCS nevykazoval statisticky významnou aktivitu cytochromu P450 1A. Dále byl měřen oxidativní stres s fluorescenčním barvivem dichlorofluorescein (DCFH-DA), přičemž statisticky významná tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS) byla prokázána u čtyř chemikálií, nejvýznamnější nárůst byl naměřen u TCS. THM vykazoval antioxidační účinek.

Klíčová slova

Rybí tkáňové linie, produkty osobní hygieny, ekotoxicita, životaschopnost buněk, EROD, ROS

Abstract

Five substances from the group of so-called personal care products, known for their low degradability and regular environmental detection, were tested for toxicity using two fish tissue lines (RTgill-W1 a RTG-2) isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The tested substances were hexadecylpyridinium chloride (HDP), chlorhexidine (CHX), octenidine (OCT), thymol (THM) and triclosan (TCS).

A cell viability assay was performed with each of these compounds using Alamar Blue TM (AB), 5-carboxyfluorescein diacetate acetoxymethyl ester (CFDA-AM) and neutral red (NR) protocols. The results were used to construct dose-response curves along with an EC₅₀ value for each of these substances. The EC₅₀ values ranged from 0,51 (HDP) to 33,75 µg.ml⁻¹ (THM) for RTgill-W1 and from 0,31 (HDP) to 33,37 µg.ml⁻¹ (THM) for RTG-2. The theoretical LC₅₀ estimation was calculated according to Tanneberger et al. (2013). For all substances, cytochrome P450 1A activity was monitored using 7-ethoxyresorufin-o-deethylase (EROD), four out of five tested chemicals were statistically positive for EROD, the highest EROD response was observed for the most toxic compound - HDP. Only TCS did not show statistically significant cytochrome P450 1A activity. In addition, oxidative stress was measured with the fluorescent dye dichlorofluorescein (DCFH-DA), with statistically significant increase of reactive oxygen species (ROS) production in four out of those five chemicals, the most significant increase was found for TCS. THM showed an antioxidant effect.

Key words

Fish cell lines, personal care products, ekotoxicity, cell viability, EROD, ROS

Obsah

1	Úvod	10
2	Teoretická část	12
2.1	Tkáňové linie.....	12
2.2	Typy kultur živočišných buněk.....	14
2.3	Rybí tkáňové linie.....	15
2.3.1	Historie.....	16
2.3.2	Morfologie.....	16
2.4	Péče o buněčné kultury.....	19
2.4.1	Zamrazování buněk.....	20
2.5	Využití v ekotoxikologii.....	21
2.5.1	Měření životaschopnosti buněk.....	22
2.5.2	Měření EROD.....	25
2.5.3	Měření ROS.....	26
2.6	Farmaka a produkty osobní hygieny.....	27
3	Cíle práce	33
4	Materiál a metodika	34
4.1	Použité chemikálie.....	34
4.2	Použitý materiál.....	35
4.3	Přístrojové vybavení a software.....	36
4.4	Druhy a původ použitých kultur.....	36
4.4.1	Péče o kultury.....	36
4.5	Příprava expozičního média.....	38
4.6	Ekotoxikologické testy.....	39
4.6.1	Postup testu - Alamar Blue™ + CFDA-AM.....	39
4.6.2	Postup testu - Neutral red.....	40
4.6.3	Postup testu - EROD.....	40
4.6.4	Postup testu - ROS.....	41
4.7	Statistická analýza.....	42
5	Výsledky a diskuze	44
5.1	Testy životaschopnosti.....	44
5.2	EROD.....	50
5.3	ROS.....	57
6	Závěr	63

Seznam zkratek

96h LC ₅₀	koncentrace, která způsobuje 50% úmrtnost při daném efektu po 96 hodinách expozice
AhR	receptor pro aromatické uhlovodíky (z angl. Aryl Hydrocarbon Receptor)
ATCC	Americká sbírka typových kultur (z angl. American Type Culture Collection)
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. Bovine Serum Albumin)
CF	5-karboxyfluorescein
CFDA-AM	5-karboxyfluorescein diacetát acetoxymethyl ester
CYP1A	cytochrom P450 1A
DCFH-DA	dichlorofluorescein diacetát
DCF	dichlorofluorescein
DMSO	dimethyl sulfoxid
DPBS	fosfátový pufr
EC ₅₀	koncentrace, která způsobuje 50% účinek daného efektu
EC ₀₅	koncentrace, která způsobuje 5% účinek daného efektu
ECACC	Evropská sbírka buněčných kultur (z angl. European Collection of Cell Culture)
EMEM	Eaglovo minimální esenciální médium (z angl. Eagle's Minimal Essential Medium)
ER roztok	ethoxyresorufin roztok
EROD	ethoxyresorufin-o-deethyláza
FBS	fetální hovězí sérum (z angl. Fetal Bovine Serum)
GSH	glutathion

HDP	hexadecylpyridinium chlorid
HepG2	nádorová lidská jaterní buněčná linie
HMEM	Hankovo minimální esenciální médium (z angl. Hank's Minimal Essential Medium)
CHX	chlorhexidin
L-15	Leibovitz L-15 médium
L-15/ex	Leibovitz L-15 médium expoziční
LC ₅₀	koncentrace, která způsobuje 50% úmrtnost při daném efektu
LOEC	nejnižší koncentrace s pozorovaným účinkem (z angl. Lowest Observed Effect Concentration)
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyltetrazolium bromid
NOEC	nejvyšší koncentrace bez pozorovaného účinku (z angl. No Observed Effect Concentration)
NR	3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazin hydrochlorid (Neutral Red)
OCT	octenidin
OPE	roztok octenidinu a fenofyethanolu
PAU	polyaromatické uhlovodíky
PCB	polychlorované bifenily
PCPs	produkty osobní hygieny (z angl. Personal Care Products)
Pen-Strep	směs penicilinu a streptomycinu
PLHC-1	jaterní buněčná linie <i>Poeciliopsis lucida</i>
PPCPs	farmaka a produkty osobní hygieny (z angl. Pharmaceuticals and Personal Care Products)
RCF	relativní centrifugací síla (z angl. Relative Centrifugal Force)

ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. Reactive Oxygen Species)
RTG-2	tkáňová linie ze pstruha duhového izolovaná z gonád
RTgill-W1	tkáňová linie ze pstruha duhového izolovaná ze žaber
Saos-2	osteoblastická buněčná linie
SD	směrodatná odchylka
TCS	triclosan
THM	thymol
WHO	světová zdravotnická organizace (z angl. World Health Organization)

1 Úvod

Ekotoxikanty jsou dle definice látky antropogenního původu mající potenciál negativně ovlivňovat životní prostředí i ve velice nízkých koncentracích (Connell et al., 1999). Při vstupu ekotoxikantů do životního prostředí nastává riziko, že jejich působení mohou být vystaveni i lidé. Pochopení, jak ekotoxikanty působí na ryby, nám může posléze pomoci při hodnocení rizik spojených s přítomností těchto látek v životním prostředí. V neposlední řadě má studium vlivu ekotoxikantů i hospodářský a ekonomický význam. Zejména v rybářství je důležité zdraví a celková kondice ryb, a proto je nutné sledovat, jak např. krmivo nebo léčivo jednoho druhu ryb ovlivňuje druhy jiné (Bols et al., 2005). Kromě zmíněných látek, lze ryby použít jako modelové organismy pro studium potenciálně negativních účinků/ekotoxicity nejrozličnějších xenobiotik. Zároveň se použití tkáňových linií v posledních letech jeví jako vhodná alternativa oproti testování cílených látek na živých rybách.

Tato práce se zabývá vybranými látkami ze skupiny tzv. produktů osobní hygieny (PCPs), které jsou běžně přidávány např. do zubních past, ústních vod, pleťové a vlasové kosmetiky a opalovacích krémů chránících před UV zářením. Na rozdíl od farmak, produkty osobní hygieny nemusejí procházet lidským tělem, ale při používání vstupují do životního prostředí odpadními vodami při sprchování, koupání nebo čištění zubů (Ternes et al., 2004). Vzhledem částečně lipofilní povaze většiny těchto látek dochází k jejich částečné sorpci na kal z čistíren odpadních vod a posléze i na vodní sedimenty (Östman et al., 2017, McClellan and Halden, 2010).

Cílem této práce bylo otestovat vybrané látky ze skupiny PCPs *in vitro* na dvou typech rybích tkáňových linií a získat tak zcela nové informace o jejich potenciální toxicitě. Výsledky mohou doplnit řadu již publikovaných *in vitro* experimentů s různými typy buněk (např. Dayeh et al., 2002, Kienzler et al., 2012, Caminada et al., 2006).

Za tímto účelem byly provedeny testy na tkáňových liniích ze pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*), konkrétně byly použity tkáňové linie žaberních buněk (RTgill-W1) a buněk gonád (RTG-2). U obou buněčných linií byla testována životaschopnost buněk pomocí protokolů s fluorescentními barvivy, které jsou běžně v publikacích pro hodnocení cytotoxicity potenciálně nebezpečných látek používány. Podle

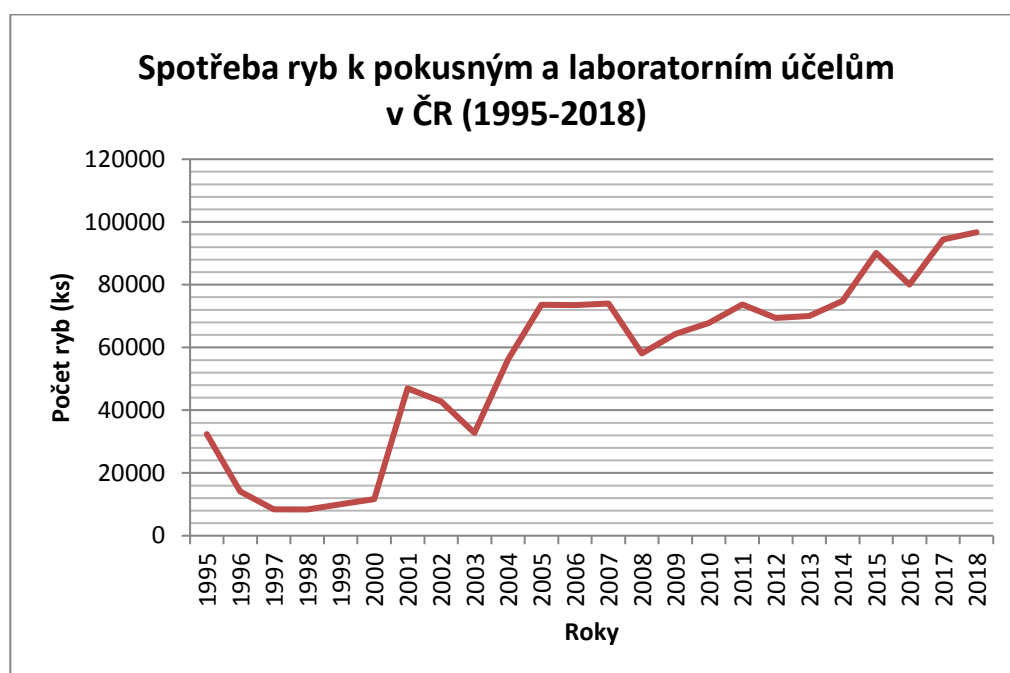
výsledných hodnot EC_{50} byly poté predikovány hodnoty LC_{50} pro živé ryby. Dalšími testy bylo měření indukce aktivity cytochromu P450 1A, kde je využito zvýšení koncentrace tohoto enzymu v organismu vlivem expozice xenobiotiku, a sledování oxidativního stresu po vystavení testovaných látek buněčné linii. Během vystavení organismu xenobiotiku se zvyšuje hladina reaktivních forem kyslíku a kvůli této nerovnováze vzniká již zmíněný oxidativní stres.

2 Teoretická část

2.1 Tkáňové linie

Testování akutní toxicity na rybách je jeden z nejčastěji používaných testů na zvířatech při hodnocení rizik pro životní prostředí. Tento test vyžaduje až 60 ryb a trvá 5 dní, kdy se produkuje litry toxického odpadu a následkem je úhyn testovaných ryb (OECD, 2019). V roce 2011 bylo podle poslední sedmé zprávy o statistických údajích týkajících se počtu zvířat používaných pro pokusné a jiné vědecké účely v členských státech Evropské unie pro požadavky REACH použito zhruba 324 000 ryb (Commission for European Communities, 2013), což je oproti roku 2008 více než dvojnásobek (Commission for European Communities, 2010).

Taktéž v České republice dochází k nárůstu spotřeby ryb k pokusným a laboratorním účelům, viz obr. 1:



Obr. 1: Křivka vyobrazuje spotřebu ryb (v ks) pro pokusné a laboratorní účely od roku 1995 do roku 2018, kdy dochází k jejímu maximu – 96 720 ks ryb (16 150 kusů druhu danio pruhované (*Danio rerio*), 80570 kusů ostatních druhů ryb). Nejvíce ryb konkrétně v tomto roce bylo využito Ministerstvem životního prostředí (upraveno podle eagri.cz)

Danio pruhované a pstruh duhový jsou celosvětově nejpoužívanější ryby při testech akutní toxicity. Právě nadměrné používání živých ryb a další níže uvedené důvody vedou ke snaze využívat buněčné modely, které mohou fungovat jako žádoucí náhrada za živé ryby. Plné nahrazení *in vivo* experimentů však zatím není možné (Schirmer, 2006).

Dosud nejvhodnější alternativou se jeví právě *in vitro* testy s tkáňovými liniemi. Tkáňové kultury umožňují sledovat cytotoxicitu v kontrolovatelných a předem definovaných podmínkách. Oproti studiím se živými zvířaty poskytují tkáňové linie několik výhod, mezi něž patří: rychlejší dosažení výsledků, méně toxického odpadu, snadnější péče, nižší náklady a především omezení testování na živých zvířatech (Bols et al., 2005). Navíc interpretace výsledků je snadnější, protože v systému chybí složitosti spojené s *in vivo* pokusy, jako je např. bioakumulace, individualita jedinců apod. Naproti tomu je výhodou *in vivo* experimentů oproti *in vitro* možnost pozorování přímé reakce testovaného organismu na aplikovanou cizorodou látku spolu se všemi toxikodynamickými a toxikokinetickými procesy, jako jsou např. přestup do těla, metabolismus, hormonální sekreci, vylučování apod. (Bhanushali et al., 2010). *In vitro* modely totiž nezahrnují celý rozsah míst účinku (přestupy do organismu přes kůži nebo sliznice) a neumožňují předpovědět reakci organismu jako celku různých tkání, kde probíhá nesčetné množství biochemických procesů, které mohou být testovanou látkou ovlivněny (Pampaloni et al., 2007).

Tkáňové linie se dají získat ze dvou zdrojů; sbírka kultur nebo vědecká komunita. Jedním z nejznámějších zdrojů je Americká sbírka typových kultur (ATCC), která jako jeden z největších zdrojů shromažďuje až 4 000 lidských buněčných linií, buněčné linie až ze 150 druhů zvířat a další. Další zdrojem může být Evropská sbírka buněčných kultur (ECACC). Nejsložitější variantou je v neposlední řadě možnost izolace vlastní tkáňové linie v laboratoři.

Savčí vs. rybí tkáňové linie

Vývoj a použití rybích tkáňových linií je víceméně odvozeno od zkušeností se savčími tkáňovými liniemi. Kultivace rybích a savčích tkáňových linií je prováděna v obdobných médiích, avšak s výrazně odlišnou teplotou. Rybí tkáňové linie jsou snadno kultivovatelné ve většině bazálních médiích, které byly optimalizovány pro savčí buňky, a to i se stejnými aditivami, např. fetální hovězí sérum (FBS). Savčí

buňky jsou kultivovány při teplotách 34-37 °C. Rybí buňky, buňky ektotermních živočichů, snesou širší rozpětí teplot. Např. buňky pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) je možné kultivovat v teplotách od 5-26 °C, přičemž optimální teplota pro růst je 18-22 °C. Pokud není k dispozici termostat, rybí buněčné linie je možné kultivovat i při pokojové teplotě (Bols et al., 2005). Se studenokrevností souvisí i nižší rychlost metabolismu, díky čemuž lze buňky uchovávat s menší péčí po delší dobu. U buněčných linií z mořských druhů ryb musí být navíc upravena osmolarita. Celkově jsou rybí tkáňové linie oproti savčím snadnější na údržbu a manipulaci (Wolf and Quimby, 1976).

2.2 Typy kultur živočišných buněk

Existují tři typy kultur, které lze při studiu živočišných buněk použít. Prvním typem je primární kultura (primokultura), ze které je právě buněčná kultura (sekundární kultura) vyvinuta (Bols et al., 2005). Zpravidla jde o směs různých typů buněk původní tkáně. O tom, jak získat z primární kultury pstruha duhového buněčnou kulturu, pojednává publikace autorů Bols et al. (1994). Buněčná kultura vzniká po první pasáži primokultury a zaniká po 30-50 děleních (Hayflickova mez). Pojem Hayflickova mez nebo také Hayflickův limit byl definován v roce 1961 pro lidské buňky, které mohou prodělat jen omezený počet dělení (Hayflick and Moorhead, 1961). Dalším typem je buněčná linie (trvalá buněčná linie), kterou je možné uchovávat v řádu měsíců (Bols et al., 2005).

Největší rozdíl mezi těmito typy je délka jejich „životu“. Primární kultura je iniciována z buněk, tkání nebo orgánů a její životnost je pouze v řádu několika dní (Lee et al., 2009). Extrémní výjimkou jsou například hematopoetické kultury ze pstruha duhového ze sleziny a z hlavové (přední) části ledviny, které mohou být udržovány po dobu až jednoho roku (Ganassin and Bols, 1996). Primární kultura je ukončena rozdělením buněk do nových kultivačních nádob (Schaeffer, 1990). Počet buněk díky proliferaci roste, proto je nutné snižovat hustotu buněk rozdělováním do dalších kultivačních nádob, jako jsou např. kultivační lahve nebo Petriho misky. Tomuto procesu se říká tzv. pasážování buněk, jehož součástí je odlepení buněk od povrchu kultivační nádoby (u adhezaních buněk) nebo centrifugace (u suspenzních buněk)

a výměna růstového kultivačního média. Buněčnou kulturu je možné zamrazit pro dlouhodobé uskladnění a pozdější použití (Bols et al., 2005).

Díky možnosti pasážování a vyšší homogenitě jsou buněčné linie nejvhodnější pro rutinní experimenty a testování. Další výhodou oproti primárním kulturám je, že buněčné kultury a linie poskytují právě díky pasážování větší množství buněk, neboť některé orgány ryb nebo samotné druhy nejsou dostatečně velké na to, aby poskytly dostatek materiálu pro primární kulturu potřebnou pro expozici xenobiotiku. Nevýhodou primárních kultur je také obtížný a finančně náročný chov ryb potřebných pro izolaci zmíněné kultury (Bols et al., 2005)

2.3 Rybí tkáňové linie

Tkáňové linie z druhů kostnatých ryb jsou vyvinuty z nejrůznějších orgánů, jako jsou např. ploutve, srdce, slezina, žábry, gonády, játra nebo mozek (Fryer and Lannan, 1994). Do roku 2011 bylo izolováno 283 buněčných linií z ryb (Lakra et al., 2011), přičemž největší počet linií byl izolován z kaprovitých a lososovitých druhů (Fryer and Lannan, 1994). Od této doby nebyl publikován žádný souhrnný přehled, který by sumarizoval nové buněčné linie izolované z ryb, přestože od té doby nové linie vznikají (Kapoor et al., 2013, Chen et al., 2019).

Jak již bylo zmíněno, většinu rybích kultur lze kultivovat v obdobných médiích vyvinutých pro savčí tkáňové linie. Požadavkům pro buňky savců, ptáků, obojživelníků i ryb se nejvíce blíží Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM) doplněné fetálním hovězím sérem, které je ze všech dostupných doplňků nejpoužívanější (Wolf and Quimby, 1966, Lakra et al., 2010). Složení tzv. Eaglova média bylo poprvé definováno v roce 1955 (Eagle, 1955). Příklad séra se podle dostupné literatury pohybuje od 5–20 objemových % (Dayeh et al., 2002, Lee et al., 2009, Fischer et al., 2019). Další média často využívaná u ryb jsou například Glasgow MEM, Hank's MEM (HMEM) nebo Leibovitz's L-15 (L-15). U média L-15 není díky jeho složení vyžadována kultivace buněk při 5% CO₂ atmosféře (Leibovitz, 1963), a proto je využíváno nejvíce a to až u 80 % rybích tkáňových linií (Wang et al., 1995).

2.3.1 Historie

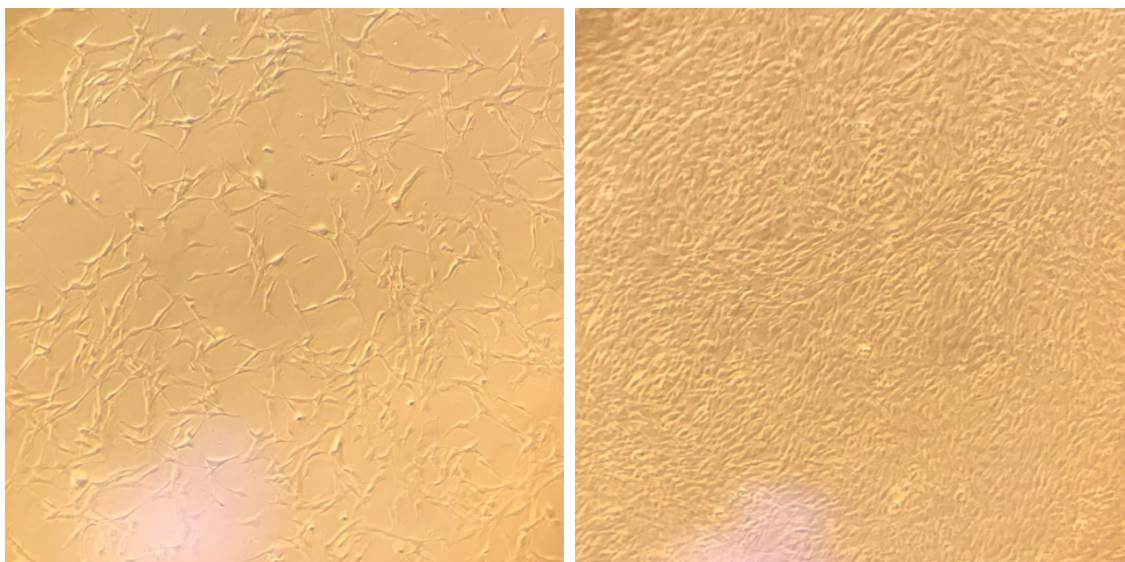
Počátek buněčných kultur začíná v roce 1885, kdy Roux kultivoval embryonální kuřecí buňky ve fyziologickém roztoku. Poté v roce 1887 byl Arnoldem pozorován pohyb a chování žabích buněk. Avšak o první tzv. „tkáňovou kulturu“ se jednalo až v roce 1907, kdy Harrison po několik týdnů kultivoval a pozoroval růst buněk nervové tkáně žabího pulce na koagulované žabí lymfě. Od té doby se kultivace začala rozvíjet a kultivační metody zdokonalovat (Biologie a genetika pro bakaláře, 2014).

První rešeršní práce o rybích tkáňových kulturách je z roku 1914 (Osowski, 1914). V roce 1916 bylo popsáno médium založené na mořské vodě (Lewis, 1916). Jedna z prvních rozsáhlejších prací věnující se rybím tkáňovým liniím je publikace od Cameron (1950), která přinesla velké množství informací o tkáňových liniích a rybích buňkách a zároveň poskytla základ pro vývoj dalších technik a metod pro práci s rybími buňkami.

První rybí buněčná linie byla izolována ze pstruha duhového a to konkrétně ze směsi samčích a samičích gonád s označením RTG-2 (Wolf and Quimby, 1962). První souhrn rybích buněčných a tkáňových linií byl vytvořen Wolfem a Mannem (1980). Poslední takový přehled byl publikován v roce 1994 autory Fryer a Lannan, který popisuje 159 buněčných linií, které jsou vyvinuty ze 74 druhů ryb. Tento souhrn doplňuje publikace z roku 2010 (Lakra et al.) o dalších 124 nových buněčných linií.

2.3.2 Morfologie

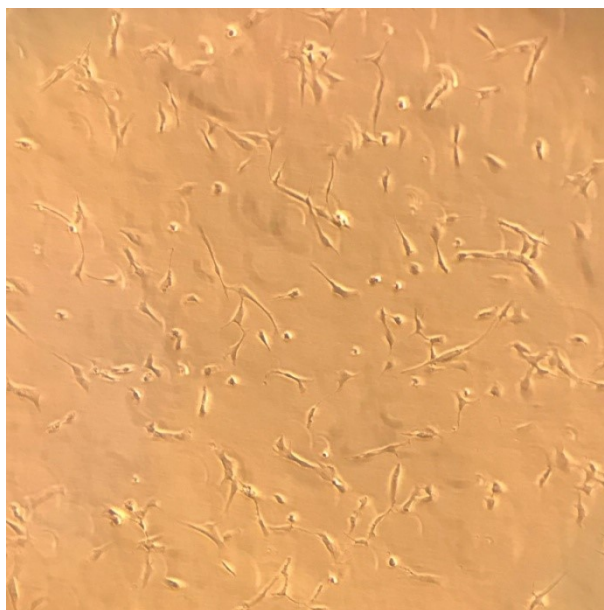
Buňky jednotlivých buněčných linií se od sebe tvarově liší. Tvar buněk se liší také v závislosti na hustotě buněk v kultivační nádobě a na fázi buněčného cyklu (Bols et al., 1994). Při vyšší hustotě buňky vytvářejí buňky tzv. monovrstvu, viz obr. 2.



Obr. 2: Příklad tvarové rozdílnosti buněk z buněčné linie RTgill-W1 při nízké denzitě (vlevo) a při vyšší denzitě buněk (vpravo) – monovrstva (zvětšení 100x) (foto vlastní)

RTgill-W1

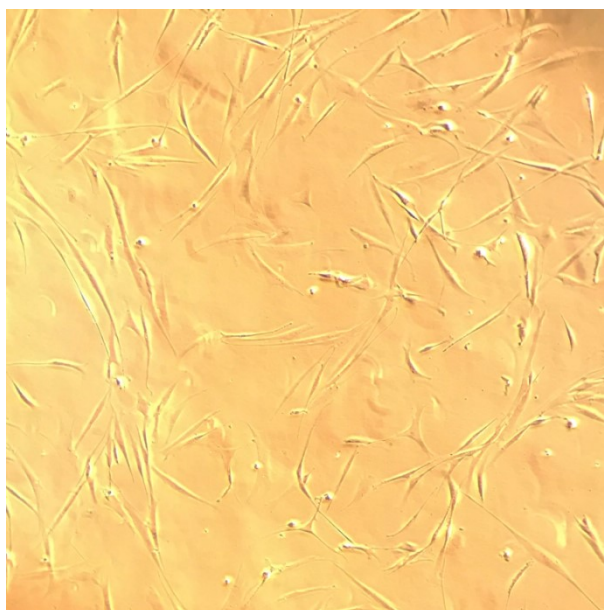
Buněčná linie RTgill-W1 je linie získaná ze žaberních vláken dospělého pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) (Bols et al., 1994). Jádra buněk linie RTgill-W1 jsou kulatého až oválného tvaru a vykazují epiteliální morfologii (Lee et al., 2009). Mitochondrie jsou obvykle kulaté. Při nízké denzitě mají buňky vřetenovitý nepravidelný tvar (Bols et al., 1994), viz obr. 3. Tato buněčná linie je vhodná pro testy akutní toxicity, neboť žaberní epitel je jedním z primárních míst příjmu toxikantů vyskytujících se ve vodě (Tanneberger et al., 2013). Buněčná linie RTgill-W1 se běžně kultivuje v Leibovitz's L-15 médiu (Leibovitz, 1963).



Obr. 3: Buněčná linie RTgill-W1 pod mikroskopem (zvětšení 100x) (foto vlastní)

RTG-2

Buněčná linie RTG-2 je mixem samčích a samičích gonád pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) (Wolf and Quimby, 1962). Buňky mají oproti RTgill-W1 podlouhlý tvar a vykazují fibroblastickou morfologii, viz obr. 4. Buněčná linie RTG-2 se kultivuje v EMEM médiu při 5% CO₂ atmosféře (Ferrero et al., 1998) nebo je možná i kultivace bez CO₂ atmosféry v L-15 médiu (Reinhart and Lee, 2002).



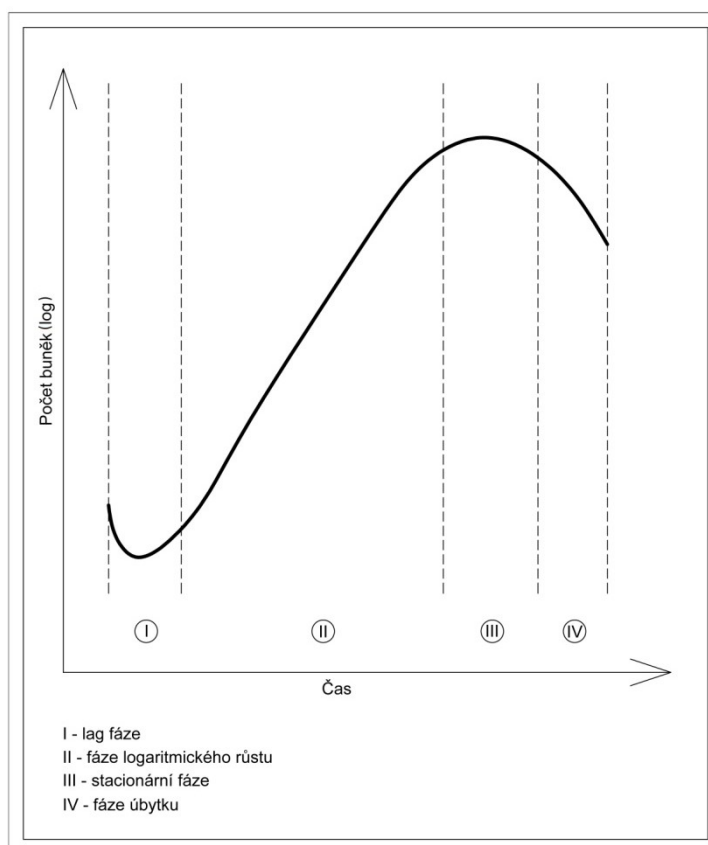
Obr. 4: Buněčná linie RTG-2 pod mikroskopem (zvětšení 100x) (foto vlastní)

2.4 Péče o buněčné kultury

Se všemi tkáňovými liniemi se pracuje ve sterilním prostředí v rámci laminárního flow boxu, čímž je zamezeno možnosti kontaminace. Kultivační médium tvoří vrstvu kapaliny nad adherovanými buňkami v lahvi. Obsahuje fosfátový pufr obohacený o anorganické soli, esenciální aminokyseliny, vitamíny, mastné kyseliny nebo lipidy (Wolf and Quimby, 1969). Do média jsou dále přidávána séra, která doplňují významné organické látky, např. hormony a růstové faktory. Častým organickým aditivem je FBS, které obsahuje právě nejvíce růstových faktorů. FBS se získává z plodu březích krav určených k porážce, a to bez anestezie. Díky tomu je tato metoda odběru FBS často kritizována (Jochems et al., 2002). Optimální pH média je 7,4. Jako indikátor změny pH lze do média přidat např. barvivo fenolová červeň (obsažena např. v EMEM médiu). Rostoucí buňky vylučují do média kyselé metabolity, jimiž je pH média snižováno a médium žlutne, to značí nutnost jeho výměny. I teplota a koncentrace CO₂ mohou pH média ovlivnit, proto je třeba zamezit náhlým změnám podmínek (Biospherix, 2019).

Pasážováním buněk se rozumí cílené snižování hustoty buněk v kultivační nádobě spojené s odlepením adherovaných buněk pomocí trypsinu od povrchu lahve a přenesení do nové nebo stejné nádoby. Pasážování se provádí při pokryvnosti cca 80 % kultivační lahve, stav narostlých buněk je kontrolován pod mikroskopem. Aktivní látkou při inhibici trypsinu je právě fetální hovězí sérum. K pasážování dochází při vysoké hustotě buněk v lahvi, při potřebě buňky „namnožit“ do více kultivačních lahví nebo pro použití buněk do experimentů. V takovém případě se koncentrace buněk upravuje podle potřeby. K počítání buněk je možné použít Bürkerovu počítací komůrku nebo automatickou počítací komůrku, která byla využita v této práci.

Růst buněk je definován čtyřmi fázemi, které zobrazuje růstová křivka (obr. 5).



Obr. 5: Růstová křivka buněk (upraveno podle Eppendorf Handling Solutions, 2019)

První fázi (I) je lag fáze, kdy počet buněk vlivem adaptace na kultivační prostředí nejdříve mírně poklesne a poté začne populace rapidně narůstat. Následuje logaritmická neboli log fáze (II), kdy počet buněk narůstá exponenciálně. Ve stacionární fázi (III) se buňky díky vyčerpání živného média a inhibičním mechanismům přestávají množit. Poslední je fáze úbytku buněk (IV), ke kterému dochází vlivem nedostatku živin a snížení pH. Může také docházet ke kumulaci toxických metabolitů (Eppendorf Handling Solutions, 2019)

2.4.1 Zamrazování buněk

Buněčné linie podléhají změnám, které jsou způsobeny stárnutím buněk nebo změnami prostředí. Pro zachování homogenity linie je nutné buňky kryogenně uchovat a v případě potřeby znovu rozmrazit. Teploty pod $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ zajišťují úplné zastavení biologického času, čímž se výrazně prodlužuje životnost buněk (Mazur, 1984).

Během počátečního chlazení (z pokojové teploty na 0 °C) se zpomaluje buněčný metabolismus, narušuje se aktivní transport a iontové pumpy. Vlivem chlazení se vytvářejí ledové krystaly v extracelulárním prostředí, které zvyšuje koncentraci rozpouštědla (nejčastěji dimethyl sulfoxid) v kultivačním médiu. Díky tomu se voda dostává z buněk do částečně zmrazeného média v extracelulárním prostoru a dochází k procesu dehydratace a smrštění buňky. Při tomto procesu závisí na rychlosti chlazení. Pokud je chlazení příliš rychlé, vzniknou ledové krystaly před dehydratací a mohou narušit buněčné organely a membrány, to má za následek smrt buňky při rozmrazování. I při pomalém zchlazení však může dojít k buněčné smrti. Buněčným smršťováním může dojít k poškození membrány, cytoskeletu i organel (Mazur, 1984). S využitím speciálního mrazicího boxu je možné dosáhnout rychlosti chlazení buněčné suspenze 1 °C za minutu.

Výhody zamrazených kultur

- Mezi jediné finanční náklady patří udržení buněk při velmi nízkých teplotách, tzn. zajištění mrazicího boxu s teplotou cca -130 °C.
- Takto uložené kultury jsou zdrojem při doplnění ztrát živých buněk např. při kontaminaci.
- U buněk zamrazených na -130 °C a méně nedochází prakticky k žádným změnám a je možné se k nim kdykoli vrátit, např. při dlouhodobých pokusech.

2.5 Využití v ekotoxikologii

Ryby jsou důležitou skupinou obratlovců při hodnocení ekotoxicity nejrozumnějších kontaminantů, které mají antropogenní původ a dostávají se do vody zejména právě lidskou činností. Kromě ekotoxikologie nacházejí rybí tkáňové linie, jakožto vhodná alternativa k živým rybám, další využití v oblasti endokrinologie, imunologie, virologie, biotechnologie a akvakultury a další. Rybí tkáňové linie jsou v ekotoxikologii využívány více než savčí, neboť chemikálie a vodné vzorky mohou být buňkám aplikovány v takových teplotách, kterým jsou běžně ryby chemikáliím vystaveny (Bols et al., 2005).

Hodnocení cytotoxicity může být provedeno různými způsoby, při kterých se sleduje zejména životaschopnost buněk. Obvyklá expozice při těchto testech je 72 a méně hodin, tudíž se jedná o akutní nebo krátkodobý test (Bols et al., 2005). Testy cytotoxicity jsou založeny na různých buněčných funkcích a v současné době je využíváno široké spektrum těchto testů. Výběr vhodné metody je důležitý bod pro sledování cytotoxicity. Při výběru testu je třeba vzít v úvahu důležité parametry, jako je např. proveditelnost testu v laboratoři, testované chemikálie, detekční mechanismus a citlivost testovaného organismu. První publikací věnující se toxicitě a využití tkáňových linií je z roku 1968 (Rachlin and Perlmutter, 1968).

Konkrétní využití

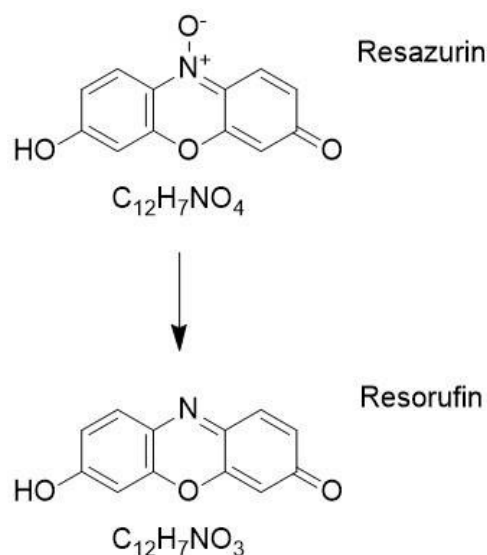
Výsledky *in vitro* toxicity bývají porovnávány s *in vivo* experimenty s živými rybami (Schirmer, 2006) nebo s *Daphnia* (Caminada et al, 2006). Časté je také použití vodných vzorků, které se u rybích tkáňových linií nabízí; konkrétně v publikaci Dayeh et al. (2002) jsou využity stejné testy k měření cytotoxicity jako v této práci. Publikace autorů Caminada et al. (2006) testuje cytotoxicitu farmak na dvou tkáňových liniích RTG-2 a PLHC-1 (jaterní buněčná linie *Poeciliopsis lucida*), jejichž výsledky jsou mezi sebou porovnány. Farmaka jsou předmětem experimentů i v publikaci Laville et al. (2014), kde je měřena jak cytotoxicita, tak EROD, i tvorba ROS, jako je tomu v této práci. Měření aktivity cytochromu P450 je využito i v publikaci autorů Kienzler et al. (2012), kde jsou výsledky a jejich porovnání u třech rybích tkáňových linií, nebo v publikaci Jönsson et al. (2006), kde jsou testovanými látkami persistentní organické polutanty.

2.5.1 Měření životaschopnosti buněk

Při práci s buňkami je jedním ze základních sledovaných parametrů stanovení jejich životaschopnosti (viability). Tímto termínem se rozumí určení poměru živých a mrtvých buněk v populaci. Detekce životaschopnosti buněk je zásadní např. v toxikologii, ekotoxikologii nebo ve farmakologii pro hodnocení účinků vyvolaných zkoumanými látkami, ať už chemikáliemi nebo vzorky kontaminovaného životního prostředí. Testování životaschopnosti buněk je důležité také při běžné práci s kulturami, např. při zamrazování buněk.

Existuje několik metod pro zjišťování životaschopnosti buněk. První skupina metod pro analýzu viability je založena na neporušenosti a selektivní propustnosti plazmatické membrány živé buňky. Tuto skupinu metod můžeme rozdělit na testy kolorimetrické a fluorescenční. Do této skupiny spadá test s indikátorovým barvivem Neutral Red (NR; pro lyzozomální membránovou integritu), který byl použit v této práci nebo např. MTT test (Aslantürk, 2018). Další skupinu pak mohou tvořit metody studia životaschopnosti buněk založené na detekci funkčního metabolismu. Principem těchto metod je schopnost živé buňky metabolizovat substrát na derivát, který je následně možné detekovat. Do této skupiny patří např. testy využívající fluorescenční indikátorová barviva Alamar Blue™ (AB; pro zjištění metabolické aktivity), CFDA-AM (pro buněčnou membránovou integritu). Vybrané testy pro tuto práci jsou běžně používány (Dayeh et al., 2002, Tannenberger et al., 2013).

Indikátorové barvivo Alamar Blue™ je používáno k měření metabolické aktivity. Test je založen na schopnosti živých buněk redukovat resazurin (původní název pro Alamar Blue™) na resorufin, viz obr. 6. Nefluorescentní AB je redukována na růžové fluorescentní barvivo buněčnou aktivitou, zejména spotřebou kyslíku metabolismem (O'Brien et al., 2000). Nevratná redukce resazurinu na resorufin může probíhat i díky mitochondriálním enzymům (De Fries and Mistuhashi, 1995). Resorufin je poté detekován spektrofotometricky nebo fluorometricky. Výhodou testu AB kromě cenové dostupnosti je, že nevykazuje žádné cytotoxické účinky při nízkých koncentracích vůči buňkám (při expozici maximálně 4 hodiny) (Gloeckner et al., 2001), a tak testované buňky nejsou zničeny, což umožňuje provádět na stejné sadě buněk další měření (Schreer et al., 2005).



Obr. 6: Ireverzibilní přeměna nefluorescentního resazurinu na fluorescentní resorufin

5-karboxyfluorescein diacetát acetoxyethyl ester (CFDA-AM) je dalším fluorescentním barvivem, které se používá ve studii cytotoxicity. Toto barvivo indukuje jak enzymatickou aktivitu, která vyžaduje aktivaci jeho fluorescence, tak ztrátu membránové integrity buněk, která je vyžadována k intracelulární retenci fluorescenčního produktu. Barvivo CFDA-AM je esterázami živých buněk přeměňováno z nepolárního nefluorescentního barviva na polární fluorescentní CFDA, která není schopna průchodu membránou a zůstává tak zkoncentrována uvnitř buněk s nepoškozenou membránou. Jeho množství tak závisí na membránové integritě buněk a hodnotí se měřením fluorescence (Schreer et al., 2005). Elektronicky neutrální AM ester může být vnesen do buněk při nižších koncentracích než CFDA. Po hydrolýze intracelulárními esterázami poskytuje tento AM ester také 5-karboxyfluorescein (CF). CF obsahuje extra negativní náboje, a proto je lépe zadržován v buňkách. Přítomnost CF v buňkách tedy ukazuje na integritu plazmatické membrány a může být použit jako indikátor viability buněk (Gannasin et al., 2000).

Využívají se převážně lipofilní nefluorescentní sondy schopné procházet volnou difuzí do buněk, tam jsou činností enzymů přeměněny na fluorescentní látky nesoucí náboj, díky čemuž jsou v buňce zadržovány a koncentrovány. Vedle enzymové aktivity jde tedy zároveň o stanovení membránové integrity, protože je-li cytoplazmatická membrána buňky narušena, fluorochromy jsou opět vyplavovány ven do extracelulárního prostoru.

Díky tomu, že ani jedna z těchto látek nevykazuje cytotoxické účinky vůči buněčným liniím pstruha duhového při krátkodobé expozici a podobné inkubační době lze barviva AB a CFDA-AM použít paralelně a detekovat je při různých vlnových délkách na stejné sadě buněk (Schreer et al., 2005).

Neutral Red (NR; 3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazin hydrochlorid) je často používané barvivo k měření membránové integrity lysozomů. Životoschopné buňky ve svých lysozomech zadržují NR (Hammond et al., 1980). Barvivo může být aplikováno buď před expozicí (v takovém případě se jedná o retenci) nebo po expozici (v tom případě jde o akumulaci barviva) a měření může být vyhodnoceno jak spektrofotometricky (Borenfreund and Puerner, 1984) tak i fluorometricky (Essig-Marcello and Van Buskirk, 1990).

2.5.2 Měření EROD

Cytochromy P450 jsou enzymy, které zastávají důležitou roli v metabolismu cizorodých látek. Sloučeniny, které slouží jako substrát těchto enzymů, jsou v organismu biotransformovány za vzniku polárnějších produktů. Ty pak mohou být vyloučeny, aniž by došlo k bioakumulaci. Kromě detoxikace však může dojít i k vzniku biologicky aktivnějších derivátů, které mohou mít jak pozitivní vliv, tak negativní - mohou být toxické, karcinogenní apod. Užitečným aspektem tohoto enzymu je, že má tendenci zvyšovat svou koncentraci při expozici xenobiotiku (Stiborová et al., 1999).

Sledování indukce cytochromu P450 1A (CYP1A) se používá k detekci biologických účinků polycyklických uhlovodíků (PAU), planárních polychlorovaných bifenyly (PCB) a dioxinů, neboť jsou nejsilnějšími induktory (Bucheli and Fent, 1995, Jung et al., 2001). U ryb se CYP1A vyskytuje v játrech, ale jeho přítomnost byla zjištěna i v žábách nebo v ledvinách (Sarasquete et al., 1999). Myšlenka využití indukce CYP1A jako prostředek ke sledování expozice ryb polutantům navrhli již v 70. letech Payne and Penrose (1975). Indukce CYP1A je zprostředkována vazbou xenobiotik k receptoru cytosolového receptoru pro aromatické uhlovodíky (AhR) (Whyte et al., 2000).

K měření CYP1A aktivity je potřebný substrát s detekovatelným metabolitem. Nejčastěji používanou látkou je 7-ethoxyresorufin (ER). Cytochrom P450 1A katalyzuje reakci ER na resorufin, který může být detekován fluorimetrem o excitačních a emisních vlnových délkách 530/590 nm. Reakce katalyzovaná CYP1A, kde ER je převeden na resorufin, se nazývá ethoxyresorufin-o-deethyláza (EROD).

2.5.3 Měření ROS

Termín ROS (reaktivní formy kyslíku) definuje skupinu endogenních vysoce reaktivních molekul, které obsahují kyslík, jako jsou např. kyslíkové ionty, volné radikály nebo peroxidy. Většina ROS vzniká jako přirozený vedlejší produkt např. při mitochondriálním respiračním řetězci nebo jsou uvolněny oxidázami. Škodlivé účinky ROS jsou minimalizovány antioxidačními mechanismy, které zachycují ROS a brání jejich hromadění. Při této narušení rovnováhy či nadprodukcí ROS pak může dojít ke stavu, který je nazýván oxidativním stresem (Sies, 1991). Během oxidativního stresu se hladina ROS intenzivně zvyšuje a vede např. k poškození buněčných struktur. ROS jsou cytotoxické a mohou se podílet na různých chorobách, např. diabetes, a ovlivňují buněčné procesy. Obecně mezi nejčastější účinky ROS patří poškození DNA, oxidace aminokyselin v proteinech a inaktivace specifických enzymů oxidací kofaktorů (Chapple, 1997).

Intracelulární redoxní rovnováhu reguluje hlavně glutation (GSH), který se podílí na antioxidačních obranných systémech. GSH hraje důležitou roli v celé řadě buněčných procesů, např. buněčná diferenciace, proliferace, a poruchy homeostázy. GSH se podílí na etiologii mnoha typů onemocnění. Při zvýšené hladině GSH je navýšena antioxidační kapacita a tím odolnost vůči oxidačnímu stresu (Traverso et al., 2013). Většina GSH se nachází v cytosolu, avšak malé, ale významné procento se nachází v mitochondriích. Právě mitochondriální GSH má zásadní význam při obraně před reaktivními formami kyslíku (Armstrong et al., 2002). Antioxidanty se vyznačují nízkou molekulovou hmotností a jsou podle použitého antioxidačního mechanismu rozdělovány do různých skupin (Dziezak, 1986).

K měření vzniku reaktivních forem kyslíku byl použit 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát (DCFH-DA). Nefluorescentní lipofilní DCFH-DA

vstupuje skrze buněčnou membránu. Působením intracelulárních esteráz je DCFH-DA přeměněn na DCFH, který dále reaguje s ROS a vzniká fluorescentní dichlorflorescein (DCF), jehož fluorescence může být detekována při excitačních vlnových délkách 485 nm a emisních vlnových délkách 535 nm (Chen et al., 2010).

2.6 Farmaka a produkty osobní hygieny

Souhrnný název farmaka a produkty osobní hygieny nebo též produkty osobní péče (PPCPs) zahrnuje skupinu chemikálií, kam spadají léčiva a látky, které jsou velmi často přidávané jako aditivum do produktů osobní hygieny, např. do zubních past, mýdel, sprchových gelů, krémů, kosmetiky apod. (Daughton and Ternes, 1999). Vlivem globálního nárůstu lidské populace se zvyšuje nejen potřeba opětovného využití vody, ale i její kontaminace PPCPs. Dnešní způsoby čištění komunálních odpadních vod nedostatečně odstraňují zvyšující se koncentrace PPCP obsažené v povrchových vodách, čímž se vytváří potencionální riziko rozvoje bakterií a genů rezistentních vůči antibiotikům (Cizmas et al., 2015). Zbytkové koncentrace jsou často detekovány v čistírnách odpadních vod i v úpravkách pitné vody a to díky jejich neúplnému odstranění při procesech úpravy vody (Yang et al., 2017). PPCPs jsou detekovány v těchto vodách v koncentracích ng.l^{-1} až $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Dai et al., 2015). Triclosan, chlorhexidin a hexadecylpyridinium chlorid byly detekovány v kalu z čistíren odpadních vod a v odpadní vodě a to v jednotkách ng.g^{-1} a ng.l^{-1} (Östman et al., 2017).

V posledních letech byly PPCPs uznány jako kontaminující látky kvůli jejich perzistenci v životním prostředí. Do životního prostředí se PPCPs dostávají mnohými cestami, např. spolu s komunální odpadní vodou, s odpadní vodou z nemocnic, nesprávnou likvidací nebo skrze čistírny odpadních vod a úpravny vod (Schumock et al., 2014). PPCPs lze rozdělit podle jejich vlastností a účelu do několika skupin. Léčiva obecně zahrnují antibiotika, hormony, analgetika, β -blokátory a další. Mezi produkty osobní péče (PCPs) patří např. konzervační látky, baktericidy, dezinfekční prostředky, vonné přísady apod. (Yang et al., 2017).

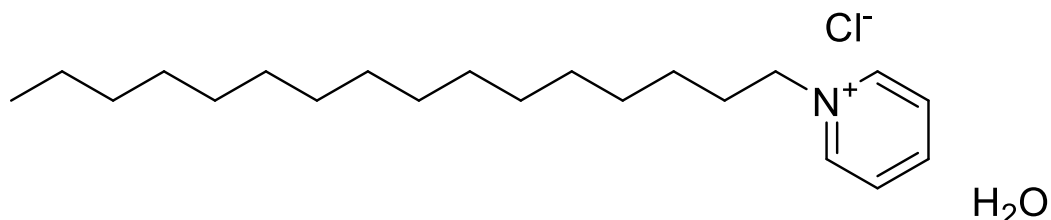
Tato práce zahrnuje pět vybraných látek ze skupiny PCPs – hexadecylpyridinium chlorid (HDP), chlorhexidin (CHX), octenidin (OCT), thymol (THM) a triclosan (TCS). Tyto látky byly vybrány zejména z důvodu, že v dostupné

literatuře chybějí experimenty a informace o toxicitě těchto látek a to ať už s živými rybami jako testovaným organismem nebo v případě *in vitro* s tkáňovými liniemi izolovanými z ryb. Tyto látky jsou lidmi široce využívány, jsou vypouštěny do životního prostředí, a proto by měly být předmětem vědeckých studií.

Hexadecylpyridinium chlorid

Hexadecylpyridinium chlorid, známý i pod názvem cetylpyridinium chlorid (systematický název: 1-hexadecylpyridinium-1-ium-chlorid), se poměrně běžně vyskytuje jako účinná látka v mnoha ústních vodách. Oproti chlorhexidinu má výhodu, že neobsahuje alkohol a nezanechává na zubech zbarvení po dlouhodobém používání (Asadoorian and Williams, 2008). Chemická struktura hexadecylpyridinium chloridu je znázorněna na obr. 7.

ECHA (2019) uvádí 96h LC₅₀ pro HDP u pstruha duhového 160 µg.l⁻¹. Nejvyšší koncentraci bez pozorovaného účinku (NOEC) pro řasy uvádí jako 3,2 µg.l⁻¹. Park et al. (2016) uvádí hodnotu EC₅₀ 0,53 mg.l⁻¹ u embrya kuňky východní.



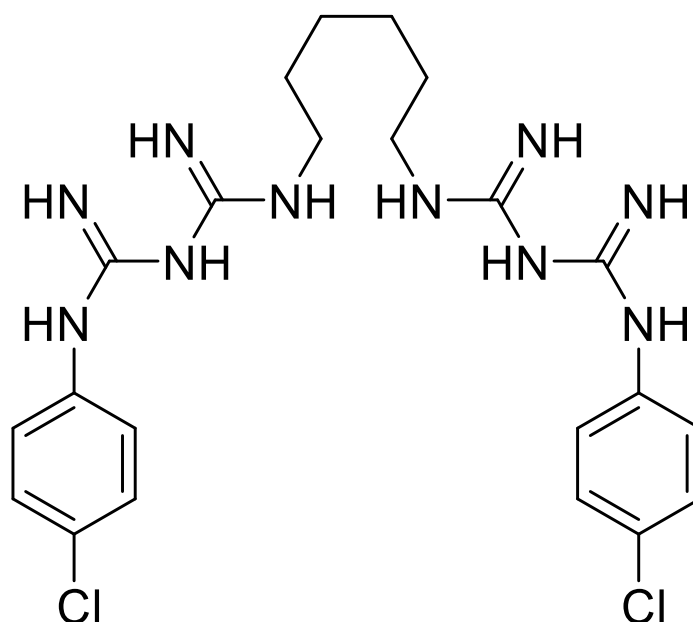
Obr. 7: Chemická struktura hexadecylpyridinium chloridu

Chlorhexidin

Chlorhexidin (systematický název: N,N-(bis(4-chlorfenyl)-3,12-diimid-2,4,11,13-tetraazatetradekandiimidamid) byl syntetizován roku 1950 a Světová zdravotnická organizace (World Health Organization; WHO) ho zařazuje do seznamu základních léků (Tartaglia et al., 2016). Chlorhexidin byl mnohokrát testován kvůli svým cytotoxickým účinkům na bakterie (Park et al., 2014, Millhouse et al., 2014). CHX byl testován na embryích dania pruhovaného a LC₅₀ po 96 hodinách expozice se

pohybovala okolo $804,0 \mu\text{g.l}^{-1}$ (Jesus et al., 2013). Chlorhexidin je podle U.S. EPA (1996) označen jako toxický pro ryby a vysoce toxický pro vodní bezobratlé, žádná konkrétní hodnota však nebyla uvedena. Lawrence et al. (2008) testovali efekt chlorhexidinu na říčním mikrobiálním biofilmu. Autoři pozorovali významné účinky při koncentraci $100 \mu\text{g.l}^{-1}$ u řas, cyanobakteriální a bakteriální biomase.

V současné době je chlorhexidin nejlepším antiseptickým přípravkem pro ústní dutinu, zejména díky dlouhodobé účinnosti v redukci zubního plaku (Wilder and Bray, 2016). Nicméně je známý i svými vedlejšími účinky; způsobuje zbarvení zubů, obsahuje alkohol a ovlivňuje vnímání chuti (Van Strydonck et al., 2012). Chemická struktura chlorhexidinu je znázorněna na obr. 8.

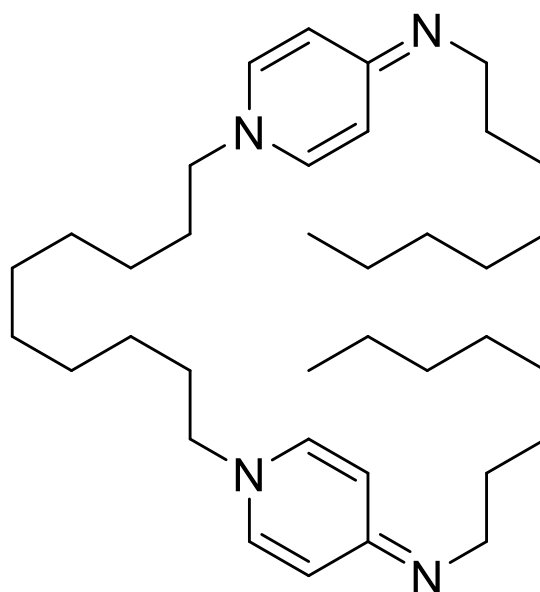


Obr. 8: Chemická struktura chlorhexidinu

Octenidin

Octenidin (systematický název: N-octyl-1-[10-(4-octyliminopyridin-1-yl)decyl]pyridin-4-imin) byl syntetizován v 80. letech 19. století (Tartaglia et al., 2016). Podle některých studií má OCT podobný antibakteriální účinek jako již zmíněný CHX (Welk et al., 2016), i jeho chemická struktura je podobná. Díky tomu široké využití octenidinu představuje také zubní hygiena (Hübner et al., 2010).

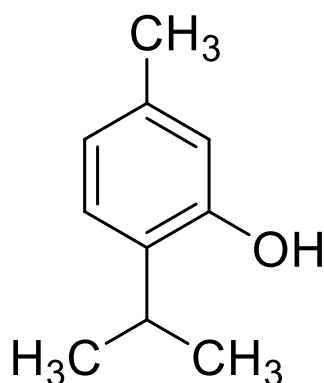
Octenidin je účinný proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím, zároveň je účinný i proti kvasinkám a houbám. Proti bakteriím je zaznamenána větší efektivita oproti chlorhexidinu (Sedlock and Bailey, 1985). Octenidin je využíván zejména při kožních onemocněních v kombinaci s alifatickými alkoholy, s detergenty, např. antiseptickým mýdlem, nebo jako roztok octenidinu a fenofyethanolu (OPE). Jeho vliv na životní prostředí však není příliš zkoumán. Chemická struktura octenidinu je znázorněna na obr. 9.



Obr. 9: Chemická struktura octenidinu

Thymol

Thymol (systematický název: 2-isopropyl-5-methylfenol) je hlavním monoterpenovým fenolem vyskytujícím se v éterických olejích z rostlin čeledi *Lamiaceae*. Tyto oleje mají využití v potravinářském průmyslu, v kosmetice, v tradiční medicíně, ale zejména jsou využívány antiseptické, protizánětlivé, antimykotické a antibakteriální vlastnosti thymolu (Marchese et al., 2016). Podle Kavooosi et al. (2013) je thymol účinnější proti grampozitivním bakteriím oproti gramnegativním. Registrován je takové jako insekticid (Hu and Coats, 2008). V takovém případě odpuzuje škůdce netoxickým způsobem působení, vůči mikroorganismům je však toxický (U.S. EPA, 1993). Chemická struktura thymolu je znázorněna na obr. 10.



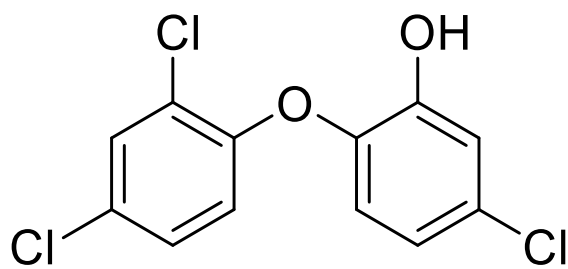
Obr. 10: Chemická struktura thymolu

Triclosan

Triclosan (5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenol) byl syntetizován kolem roku 1980 (Tartaglia et al., 2016) a je častým předmětem studií díky jeho perzistenci v životním prostředí (Coogan, 2007) a spojitostí s hormonálním systémem (Ahn et al., 2008). Ačkoli jsou zřejmé negativní účinky TCS, je stále používán jako aditivum do zubních past, kosmetiky apod., a to hlavně díky svým antibakteriálním účinkům (Koburger et al., 2010). Chemická struktura triclosanu je znázorněna na obr. 11.

Výskyt TCS ve vodních ekosystémech je celosvětovým problémem. TCS je běžně detekován v povrchových vodách v koncentracích od 1,4 do 4 000 ng.l⁻¹ a v mořské vodě od <0,001 do 100 ng.l⁻¹ (Dhillon et al., 2015). V tocích Spojených států amerických byl TCS detekován dokonce v mikrogramech na litr (Halden and Paull, 2005). Vysoké hodnoty TCS byly detekovány v lidské moči, krvi, tukové tkáni, mozku a játrech (Ruszkiewicz et al., 2017). Podle Dayan (2007) je TCS obsažen ve vysokých koncentracích i v mateřském mléce (až 2000 µg.kg⁻¹ tuku).

Triclosan je vysoce toxický pro vodní organismy, např. *Daphnia magna* (EC₅₀ = 390 µg.l⁻¹) nebo *Oncorhynchus mykiss* (EC₅₀ = 350 µg.l⁻¹) a zejména toxický je pak pro řasy. Konkrétně pro druh *Scenedesmus subspicatus* byla stanovena EC₅₀ na 1,4 µg.l⁻¹ a NOEC 0,69 µg.l⁻¹ (Orvos et al., 2002).



Obr. 11: Chemická struktura triclosanu

3 Cíle práce

- Porovnání výsledků viability buněk po expozici vybraným xenobiotikům ze skupiny PCPs na orgánové úrovni
- Predikce LC_{50} pro živé ryby ze získaných výsledků viability podle publikace Tannenberger et al. (2013)
- Sledování indukce cytochromu P450 1A po expozici vybraným xenobiotikům ze skupiny PCPs
- Sledování vlivu testovaných látek na oxidativní stres

4 Materiál a metodika

4.1 Použité chemikálie

Chlorhexidin $\geq 99,5\%$	(Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
Triclosan $\geq 97\%$	(Sigma-Aldrich, Indie)
Octenidin dihydrochlorid 98%	(Alfa Aesar, Čína)
Hexadecylpyridinium chlorid 99%	(Sigma-Aldrich, Indie)
Thymol 98%	(Alfa Aesar, Německo)
Dimethyl sulfoxid (DMSO)	(Sigma-Aldrich, Česká republika)

Na expoziční médium byly použity následující chemikálie:

NaCl	(Sigma-Aldrich, USA)
KCl	(Sigma-Aldrich, Španělsko)
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	(Sigma-Aldrich, Indie)
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	(Sigma-Aldrich, USA)
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	(Sigma-Aldrich, Německo)
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	(Lach-Ner, Česká republika)
KH ₂ PO ₄	(Lach-Ner, Česká republika)
Pyruvát sodný	(Sigma-Aldrich, Japonsko)
Galaktóza	(Sigma-Aldrich, USA)

Na kultivaci buněk byla použita tato média a chemikálie:

Leibovitz L-15	(Gibco, USA)
Medium EMEM	(ATCC, USA)
DPBS	(Gibco, UK)
Ethanol $\geq 99,8\%$	(VWR chemicals, Francie)
Pen-Strep	(Invitrogen, USA)
FBS	(Gibco, USA)
Trypsin	(Gibco, UK)
Trypanová modř	(Invitrogen, USA)

K testování toxicity bylo kromě expozičního média L-15/ex použito:

Alamar Blue™	(Invitrogen, USA)
CFDA-AM	(Invitrogen, USA)
Neutral Red	(Invitrogen, USA)
Ethanol $\geq 99,8\%$	(VWR chemicals, Francie)
Kyselina octová	(VWR chemicals, Francie)

K testování EROD aktivity bylo kromě expozičního média L-15/ex použito:

Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	(Lach-Ner, Česká republika)
NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	(Lach-Ner, Česká republika)
Fluorescamin	(Sigma-Aldrich, Francie)
Acetonitril	(VWR chemicals, Francie)
Resorufin ethyl ether	(Sigma-Aldrich, Izrael)
BSA	(Sigma-Aldrich, USA)

K měření reaktivního oxidativního stresu bylo kromě expozičního média L-15/ex použito:

DCFH-DA	(Sigma-Aldrich, Izrael)
Tert-butyl hydrogen peroxid	(Luperox, Francie)

4.2 Použitý materiál

Kultivační lahve 25/75 cm ²	(Thermo Fisher Scientific, Dánsko)
Kultivační lahve 25/75 cm ²	(VWR Interational, Čína)
Sterilní sérologické pipety 5/10/25 ml	(Jet Bio-filtration Co., Španělsko)
Kónické zkumavky - falkonky	(Jet Bio-filtration Co., Španělsko)
Eppendorfova zkumavka 1,5 ml	(Biologix group, Čína)
96-jamkové destičky Nunclon™ Delta Surface	(Thermo Fisher Scientific, Dánsko)
Autoklávovatelný zásobník na činidla	(VWR International, Čína)
Sterilní stříkačkový filtr PUDF	(Carl Roth GmbH+Co., Německo)
Kryozkumavky	(Biologix group, Čína)

4.3 Přístrojové vybavení a software

Automatická počítačící komůrka Coutess	(Invitrogen, Korea)
Spektrofotometr infinite M200 Pro	(Tecan, Rakousko)
Laminární flow box Bio-II-A/G	(Telstar, Španělsko)
Inkubátor	(Pol-Lab, Polsko)
Centrifuga Rotanta 460R	(Hettich zentifugen, Německo)
Inverzní mikroskop	(Olympus, Japonsko)
Autokláv	(BMT Medical Technology, s.r.o., Česká republika)

Grafy s toxikologickými křivkami byly zpracovány ve statistickém software OriginPro 8.5 (OriginLab).

Grafy znázorňující inhibici cytochromu P450 (EROD) a oxidativní stres (ROS) byly zpracovány v programu Excel 2007.

4.4 Druhy a původ použitých kultur

Buněčné linie použité v této práci byly zakoupeny z American Type Culture Collection (ATCC):

RTG-2 (ATCC, CCL-55)

RTgill-W1 (ATCC, CRL-2523)

4.4.1 Péče o kultury

Buněčná linie RTgill-W1 byla kultivována v médiu Leibovitz L-15 (Leibovitz, 1963) s přídavkem 10% FBS a 1% směsí penicilinu a streptomycinu (Pen-Strep), který snižuje riziko kontaminace. Výměna média probíhala jednou až dvakrát týdně, pasážování buněk probíhalo podle potřeby a množství buněk v lahvi.

Buněčná linie RTG-2 byla kultivována v EMEM médiu při 5% CO₂ atmosféře nebo v L-15 bez CO₂ atmosféry (Reinhart and Lee, 2002). Do média bylo přidáno 10% FBS a 1% Pen-Strep ze stejných důvodů jako je již zmíněno výše. Buňky obou linií

rostly lépe při 10% FBS než při 5% přídavku FBS do kultivačního média. Výměna média a pasáž buněk probíhala ve stejných intervalech jako u linie RTgill-W1.

Flow box byl před každým použitím vysvícen po dobu zhruba 10 minut UV zářením. Potřebné vybavení k práci bylo otřeno 70% ethanolem, popř. předem vysterylizováno pomocí autoklávu při teplotě 122 °C po dobu 20 minut. Při výměně média bylo nejdříve pipetou odsáto původní médium, potom bylo dno lahve opláchnuto zhruba 10 ml oplachového DPBS média. Po opláchnutí DPBS byl pro odlepení buněk používán proteolytický enzym trypsin. Bylo používáno 0,5 ml 0,25% trypsinu s délkou působení 2 minuty. Působení trypsinu bylo zastaveno kultivačním médiem obsahujícím 10 % FBS.

Před převedením buněk do 96-jamkové destičky při provádění testů byly buňky spočítány. Při počítání buněk bylo smícháno 10 μ l buněčné suspenze s 10 μ l 0,4% trypanovou modří. Buňky byly pak podle potřeby naředěny tak, aby množství buněk odpovídalo 50 000/100 μ l. Uvedený objem 100 μ l byl následně přidáván do všech vnitřních jamek 96-jamkové destičky (schéma k nahlédnutí v příloze 1 a 2), tzn. do prvního a posledního sloupce a první a poslední řady 96-jamkové destičky bylo přidáváno pouze samotné médium. Tyto krajní jamky při měření fluorescence pak sloužily jako pozad'ová fluorescence, která byla následně odečítána od naměřených hodnot.

Zamrazování buněk

Při zamrazování byly adherované buňky odlepeny trypsinem. Po 2 minutách působení trypsinu bylo přidáno kultivační médium, pro zastavení reakce. Vzniklá buněčná suspenze byla převedena do sterilní kyvety a centrifugována po dobu 5 minut, při otáčkách 500 RCF (zkratka pro relativní centrifugačí sílu). Podle potřeby byly buňky zředěny kultivačním médiem s obsahem kryoprotektiva a v objemu 1 ml napipetovány do kryozkumavek. Jako kryoprotektivum bylo použito 10% DMSO v L-15. Buňky byly mrazeny rychlostí 1 °C za 1 minutu.

Rozmrazování buněk

Rozmražení buněk probíhalo rychle kvůli uvolňování DMSO z buněk. Buňky byly rozmrazeny na pokojovou teplotu a kryomédium bylo zředěno kultivačním médiem. Následovala centrifugace – 5 minut, 500 RCF. Vzniklý supernatant byl odsát

sterilní pipetou, peleta rozředěna nejprve v malém množství kultivačního média, poté bylo doplněno potřebné množství kultivačního média a buňky byly převedeny do kultivační lahve. Velikost kultivační nádoby je zvolena podle počtu buněk.

4.5 Příprava expozičního média

Při testech bylo používáno expoziční L-15 médium (L-15/ex), které bylo připraveno následujícím způsobem podle Dayeh et al. (2013):

Roztok A: V 1000 ml MilliQ vody bylo rozpuštěno:

- 80 g NaCl
- 4 g KCl
- 2 g MgSO₄ x 7 H₂O
- 2 g MgCl₂ x 6 H₂O

Roztok B: V 1000 ml MilliQ vody bylo rozpuštěno:

- 1,85 g CaCl₂ x 2H₂O

Roztok C: V 1000 ml MilliQ vody bylo rozpuštěno:

- 4,79 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O
- 0,6 g KH₂PO₄

Roztok D: Ve 100 ml MilliQ vody bylo rozpuštěno:

- 5,5 g Pyruvát sodný

Roztok E: Ve 100 ml MilliQ vody bylo rozpuštěno:

- 9 g Galaktóza

Roztoky A, B a C byly po rozpuštění uvedených látek sterilizovány v autoklávu při teplotě 122 °C po dobu 20 minut a dále pak skladovány při pokojové teplotě. Roztoky D a E byly přefiltrovány přes sterilní filtr 0,22 µm a rozděleny do zkumavek po 10 ml. Roztoky D a E byly skladovány při teplotě -20 °C. Pracovní roztok L-15ex byl připraven smícháním 680 ml sterilní MilliQ vody se 100 ml zásobního roztoku A, B a C a 10 ml zásobního roztoku D a E.

4.6 Ekotoxikologické testy

V testech bylo podle Schirmer et al. (1997) používáno L-15/ex médium. Testované látky (CHX, TCS, OCT, HDP a THM) byly rozpuštěny v DMSO a dále ředěny L-15/ex. Pro hodnocení cytotoxicity vybraných polutantů byly použity testy s fluorescenčními barvivy Alamar Blue™, CFDA-AM a NR, které byly postaveny na stejném setu buněk a hodnotí jejich viabilitu. Tyto testy byly provedeny na obou tkáňových liniích po expozici zmíněnými chemikáliemi. Výsledky byly porovnány. Pro každou testovanou látku byly sestrojeny křivky dávka-odpověď spolu s hodnotou EC₅₀.

Rozložení destičky při testech viability je znázorněno v příloze 1. Rozložení destičky při testech na indukci cytochromu P450 1A a oxidativní stres je znázorněno v příloze 2.

4.6.1 Postup testu - Alamar Blue™ + CFDA-AM

Před použitím bylo barvivo AlamarBlue™ uchováváno při teplotě 4 °C a CFDA-AM při teplotě -20 °C. Tento test byl s úpravami proveden podle Dayeh et al. (2013). Počet buněk v jedné jamce 96-jamkové destičky byl 50 000 buněk ve 100 µl. Po 24 hodinách od přidání buněk do 96-jamkové destičky byla připravena koncentrační řada vybraných chemikálií a podle schématu v příloze 1 napipetována do 96-jamkové destičky. Jako biotická kontrola bylo použito médium L-15/ex, jako kontrola vlivu rozpouštědla bylo použito 0,1% DMSO. Tato koncentrace má reflektovat nejvyšší koncentraci DMSO v experimentu.

Po 24hodinové expozici bylo z jamek s buňkami odstraněno xenobiotikum rozpuštěné v L-15/ex za použití multikanálové pipety a buňky byly dvakrát promyty 150 µl L-15/ex. U některých buněk může docházet k odlepování ode dna jamky, proto byl kladen důraz na to, aby byly všechny roztoky přidávány svrchu do středu jamky.

Látky AB a CFDA-AM byly obě rozpuštěny v L-15/ex (Schirmer et al., 1997, Schirmer et al., 1998, Dayeh et al., 2003). Finální koncentrace Alamar Blue™ je 1,25% (v/v). K získání této koncentrace bylo rozpuštěno 125 µl roztoku Alamar Blue™ v 10 ml L-15/ex. K získání finální koncentrace CFDA-AM bylo rozpuštěno 10 µl 4mM

zásobního roztoku připraveného v DMSO v 10 ml L-15/ex. Po důkladném promytí všech jamek bylo přidáno 100 µl roztoku Alamar Blue™/CFDA-AM a následovalo 30 min inkubace při pokojové teplotě za tmy. Po inkubaci byla měřena intenzita fluorescence při excitační/emisní vlnové délce 530/590 nm pro Alamar Blue™ a 485/535 nm pro CFDA-AM. Poté byly buňky zkontrolovány pod mikroskopem a následovalo testování s indikátorovou barvou neutral red.

4.6.2 Postup testu - Neutral red

Tento test byl s úpravami proveden podle publikace Borenfreund a Puerner (1985). Před aplikací neutral red (NR) byly buňky promyty jednou 150 µl L-15/ex. Poté bylo přidáno 100 µl NR roztoku (0,03 mg.ml⁻¹ NR rozpuštěno v PBS) do každé jamky. Následovala 60min inkubace při pokojové teplotě za tmy.

Dále byly buňky dvakrát promyty 150 µl L-15/ex. Dalším krokem bylo přidání 150 µl kyselého roztoku do každé jamky. Tento kyselý roztok vznikl smícháním 1 ml ledové kyseliny octové, 50 ml ethanolu a 49 ml MilliQ vody. Intenzita fluorescence byla měřena při excitační vlnové délce 532 a emisní vlnové délce 680 nm.

4.6.3 Postup testu - EROD

Měření EROD aktivity bylo popsáno v publikaci od Hahn et al. (1996). Koncentrace buněk byla 100 000 buněk ve 100 µl. Po 24 hodinách inkubace byla připravena koncentrační řada vybraných chemikálií a podle schématu v příloze 2 napipetována do 96-jamkové destičky. Jako biotická kontrola bylo použito médium L-15/ex, jako kontrola vlivu rozpouštědla bylo použito 0,1% DMSO.

Po 24 hodinách expozice bylo z jamek odstraněno expoziční médium. Jamky byly dvakrát promyty 150 µl L-15/ex. Poté byl připraven ethoxyresorufinový roztok (ER roztok), a to následujícím způsobem:

Nejprve byl připraven fosfátový pufr, který vznikl smícháním následujících dvou roztoků až do dosažení pH 8. První roztok vznikl rozpuštěním 35,81 g Na₂HPO₄·12 H₂O v 500 ml MilliQ vody. Tím vznikl 0,2M roztok. Druhý roztok byl

připraven rozpuštěním 3,12 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ v 100 ml MilliQ vody. Tím vznikl taktéž 0,2M roztok. Poté bylo změřeno pH prvního roztoku (0,2M roztok $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) a opatrně byl přidáván druhý roztok (0,2M roztok $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) až do té doby, dokud výsledný roztok neměl pH 8. Poté byl změřen objem tohoto vzniklého roztoku a dále byl zředěn v poměru 1:1 milliQ vodou k dosažení 0,1M roztoku.

Následovala příprava již zmíněného ER roztoku. ER roztok byl připraven zředěním 2mM ER zásobního roztoku (resorufin ethyl ether) s 50mM fosfátovým pufrům v poměru 1:1 000. Vznikla tak konečná koncentrace ER roztoku 2 μM . Zásobní roztok ER byl uchováván při -20°C a fosfátový pufr při pokojové teplotě. Po přidání 100 μl ER roztoku do každé jamky byla měřena fluorescence na spektrofotometru Tecan i-control Infinite 200 Pro. Excitační vlnová délka pro resorufin byla nastavena na 530 nm a emisní vlnová délka 590 nm. Fluorescence byla měřena ihned po přidání ER roztoku každou minutu po dobu 10 minut.

Poté byl stanoven obsah bílkovin přidáním 50 μl 0,3 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ fluorescamin/acetonitrilového roztoku do každé jamky. Před měřením fluorescence bylo přímo ve spektrofotometru nastaveno orbitální třepání destičky po dobu 10 minut. Následně byla změřena fluorescence při excitační vlnové délce 365 nm a emisní vlnové délce 470 nm.

Specifická aktivita cytochromu P450 1A byla vyjádřena jako obrat ethoxyresorufinu na resorufin v pikomolech resorufinu na miligram proteinu za minutu ($\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) (Kennedy and Jones, 1994) a to za pomoci resorufinové křivky a proteinové standardní křivky. Jako kalibrační protein pro proteinovou standardní křivku byl použit hovězí sérový albumin (BSA). BSA bylo rozpuštěno v expozičním L-15/ex médiu. Do jedné jamky byl přidáván objem 100 μl , k němuž bylo napipetováno 50 μl 0,3 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ fluorescamin/acetonitrilového roztoku. Fluorescence byla měřena při excitačních vlnových délkách 365 nm a emisních vlnových délkách 470 nm.

4.6.4 Postup testu - ROS

Metoda měření ROS byla prováděna podle publikace LeBel et al.(1982) s drobnými úpravami. Buňky byly převedeny do destičky a naředěny na koncentraci

5×10^5 v 1 ml. Poté byl do jedné jamky 96-jamkové destičky přidáván objem 100 μ l buněčné suspenze.

Po 24 hodinách bylo z jamek odstraněno médium a jamky byly jedenkrát promyty 150 μ l L-15/ex. Do každé jamky bylo přidáno 100 μ l tzv. loading roztoku. Tento roztok byl připraven následujícím způsobem:

K dosažení výsledné koncentrace 20 μ M roztoku dichlorofluorescein diacetát (DCFH-DA) bylo přidáno 10 μ l 20mM roztoku DCFH-DA (rozpuštěného v DMSO) do 10 ml L-15/ex. Po přidání loading roztoku následovala 30min inkubace ve tmě v inkubátoru. Poté byl loading roztok odstraněn a jamky byly jedenkrát promyty 150 μ l L-15/ex. Dále bylo do každé jamky přidáno 100 μ l L-15/ex a byla měřena intenzita fluorescence při excitační vlnové délce 485 nm a emisní vlnové délce 535 nm.

Po 24 hodinách inkubace byla připravena koncentrační řada a podle schématu v příloze 2 byly chemikálie napipetovány do 96-jamkové destičky. Jako biotická kontrola bylo použito L-15/ex médium a jako kontrola rozpouštědla bylo použito 0,1% DMSO. Sloupec č. 4 sloužil jako pozitivní kontrola. Buňky v tomto sloupci byly očkované tert-butyl hydrogen peroxidem (t-BHP) o nejvyšší koncentraci 1 mM. Do první jamky bylo napipetováno 200 μ l 1mM roztoku t-BHP, do dalších pak po 100 μ l L-15/ex. Ředění bylo prováděno přímo v destičce v poměru 1:1 přenesením 100 μ l z první jamky do další atd. Byl měřen nárůst intenzity fluorescence ihned po přidání toxikantu, dále v časových intervalech: 30 min, 60 min, 90 min, 2 h, 4 h, 6 h a 24 h.

4.7 Statistická analýza

Viabilita

Naměřená data jsou vztažena a vyjádřena v % vůči tzv. solvent kontrole (kontrola vlivu rozpouštědla s 0,1% DMSO). Toxicita testovaných látek byla vyjadřována jako účinná koncentrace, která způsobuje 50% inhibici daného efektu vůči kontrole (EC_{50}). Všechna experimentální data byla vyjádřena jako průměr spolu se standardní směrodatnou odchylkou ze třech paralelních měření. Z dat byly pro jednotlivé chemikálie vytvořeny křivky dávka-odpověď pomocí sigmoidních křivek. Hodnoty EC_{50} byly získány prostřednictvím statistického software OriginPro 8.5. Grafy

byly zpracovány ve stejném programu. Pro reprodukovatelnost testu byla každá z chemikálií měřena 3-5x.

EROD a ROS

Výsledné hodnoty EROD a ROS testu byly vyjádřeny jako průměr 6 paralelních měření u EROD a 3 paralelních měření u ROS spolu se směrodatnými odchylkami. Pro reprodukovatelnost testu byla každá z chemikálií měřena 3x. Grafy byly vytvořeny ve statistickém software Microsoft Excel 2007. V rámci vyhodnocení zda se jednotlivé koncentrace liší/neliší od kontrolní skupiny, byl použit Mann-Whitneyův test. Tímto neparametrickým testem byly identifikovány skupiny (koncentrace), které se signifikantně lišily od kontrolní skupiny. Mann-Whitneyův test ve své nulové hypotéze předpokládá, že skupiny pocházejí ze stejného rozdělení, tedy že mezi nimi není rozdíl. Hladina významnosti byla stanovena jako $\alpha = 0,05$ a $\alpha = 0,01$. Statistické odlišnosti jsou v grafech označeny * nebo **. Data byla statisticky vyhodnocena ve statistickém software SPSS.

5 Výsledky a diskuze

5.1 Testy životaschopnosti

Kvůli své finanční dostupnosti a snadnému použití byly vybrány testy využívající fluorescenční indikátorová barviva AB, CFDA-AM a NR. Tyto testy jsou běžně používány v dostupné literatuře (Dayeh et al., 2002, Tannenberger et al., 2013). Díky neinvazivnosti vybraných testů bylo možné v rámci jednoho experimentu aplikovat všechny tři typy ukazatelů životaschopnosti na stejném setu buněk. Jako nejcitlivější ukazatel cytotoxicity se ve většině případů jevila lyzozomální membránová integrita (NR), poté membránová integrita buněk (CFDA-AM) a nakonec metabolická aktivita (AB). Tabulka 1 sumarizuje přehled výsledných hodnot. Získané hodnoty nedosahují v rámci chemikálií a tkáňových linií velkých rozdílů.

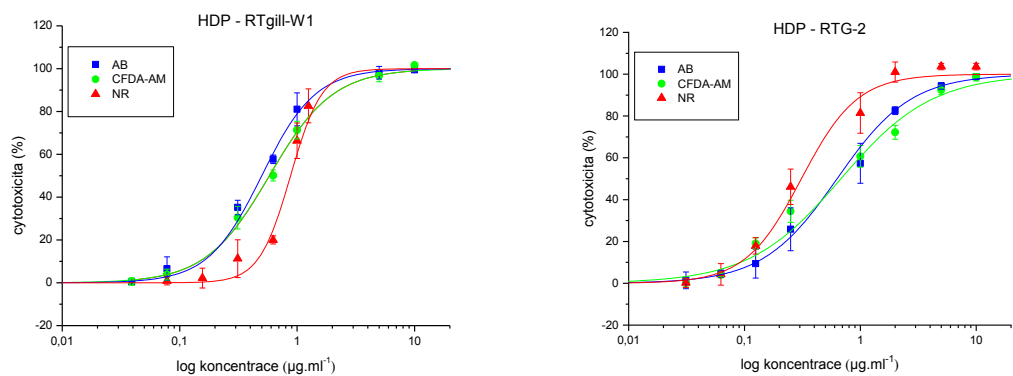
Tabulka 1: Přehled výsledných hodnot EC_{50} (v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) spolu se směrodatnou odchylkou (SD) u jednotlivých testů viability

Látka	Buněčná linie	AB	CFDA-AM	NR
HDP	RTgill-W1	0,51 ($\pm 0,05$)	0,58 ($\pm 0,03$)	0,88 ($\pm 0,02$)
	RTG-2	0,63 ($\pm 0,03$)	0,68 ($\pm 0,09$)	0,31 ($\pm 0,05$)
CHX	RTgill-W1	4,01 ($\pm 0,59$)	3,67 ($\pm 0,29$)	2,13 ($\pm 0,24$)
	RTG-2	4,21 ($\pm 0,17$)	3,32 ($\pm 0,62$)	2,06 ($\pm 0,52$)
OCT	RTgill-W1	0,74 ($\pm 0,06$)	0,81 ($\pm 0,12$)	0,87 ($\pm 0,08$)
	RTG-2	1,23 ($\pm 0,05$)	1,01 ($\pm 0,08$)	0,82 ($\pm 0,07$)
THM	RTgill-W1	33,75 ($\pm 1,13$)	31,57 ($\pm 1,79$)	22,79 ($\pm 3,38$)
	RTG-2	33,37 ($\pm 3,21$)	28,44 ($\pm 4,12$)	23,31 ($\pm 3,61$)
TCS	RTgill-W1	0,82 ($\pm 0,27$)	1,04 ($\pm 0,12$)	0,58 ($\pm 0,04$)
	RTG-2	2,15 ($\pm 0,19$)	2,28 ($\pm 0,14$)	2,07 ($\pm 0,13$)

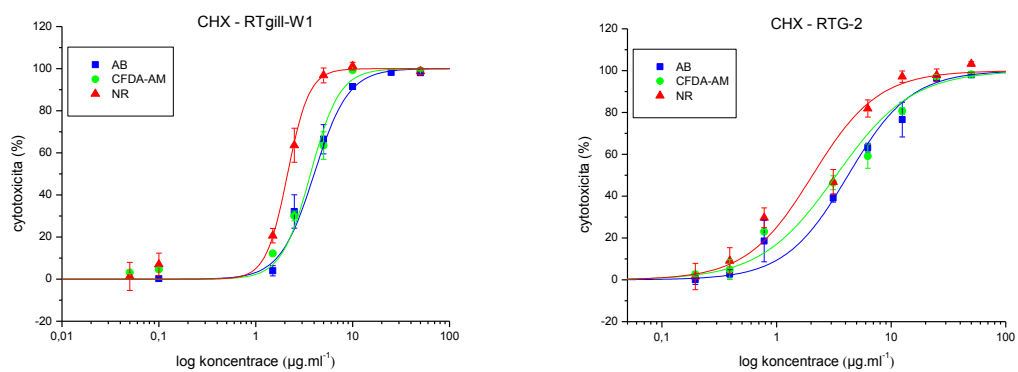
Koncentrace byly voleny tak, aby nejvyšší koncentrace obsahovala maximálně 0,1% DMSO. Vzhledem k rozpustnosti a nízké toxicitě chlorhexidinu a thymolu, nebylo možné připravit koncentraci, která by měla 100% cytotoxický účinek a současně splňovala podmínku maximální koncentrace 0,1 % DMSO. Nejvyšší koncentrace, při nichž bylo dosaženo 100% cytotoxicity, tedy nesplňují tuto podmínku.

Podle ECHA (2019) je 96h LC₅₀ pro HDP u pstruha duhového rovna 160 µg.l⁻¹. CHX byl testován na embryích dania pruhovaného a 96h LC₅₀ se pohybovala okolo 804,0 µg.l⁻¹ (Jesus et al., 2013). Kung et al. (2016) uvádí výsledky *in vitro* studie s OCT, kde se EC₅₀ pro *Trichomonas vaginalis* pohybuje v rozmezí 5,7 - 21,37 µg.ml⁻¹ po 5 min, 6,48 - 10,82 µg.ml⁻¹ po 15 min a 0,68 - 2,11 µg.ml⁻¹ po 30 min expozice. THM je možné porovnat s výsledky pro nádorovou lidskou buněčnou linii HepG2, kde se IC₅₀ rovná 60,01 µg.ml⁻¹ (Özkan and Erdoğan, 2011). Výsledné hodnoty EC₅₀ pro TCS jsou v podobném rozsahu jako hodnoty z experimentu pro *Daphnia magna*, kde se EC₅₀ rovná 0,39 µg.ml⁻¹ (Orvos et al., 2002). Výsledky z této práce není možné přímo porovnat s výsledky z testů prováděných na jiných organismech neboť citlivost různých organismů i provedení testů se liší. Uvedené hodnoty jsou tedy spíše pro představu.

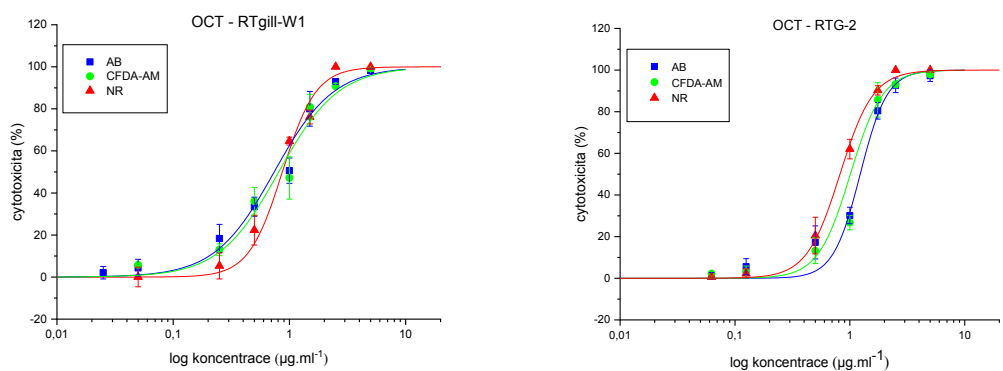
Nejméně toxickou chemikálií byl THM, a to pro obě linie. Nejtoxičtější chemikálií byl HDP, rovněž pro obě tkáňové linie. Největší rozdíl mezi liniemi byl zaznamenán u triclosanu, přičemž linie RTgill-W1 se ukázala jako citlivější oproti RTG-2. Linii RTgill-W1 lze považovat ze sensitivnější, neboť u třech chemikálií ukazuje jednoznačně vyšší citlivost vůči chemikálii, u zbylých dvou je citlivost víceméně obdobná. Na obr. 12 – 16 jsou vyobrazeny toxikologické křivky dávka-odpověď pro jednotlivé chemikálie a obě tkáňové linie. Pokud je průběh křivek všech třech indikátorových barviv podobný a leží v těsné blízkosti u sebe, jako např. na obr. 16 u tkáňové linie RTG-2, ukazuje to na poškození buněčných membrán, což zahrnuje jak poškození organel, tak i poškození cytoplazmatické membrány (Schirmer et al., 1998a). Dalším možným výsledkem může být výraznější pokles životaschopnosti buněk u měření s NR indikátorem než tomu je u AB a CFDA-AM, viz obr. 13 u tkáňové linie RTgill-W1 (Schirmer et al., 1998b). Pravděpodobně primárním poškozením bylo narušení membrány lysozomů a menší změny či poškození se týkalo metabolické aktivity a membránové integrity.



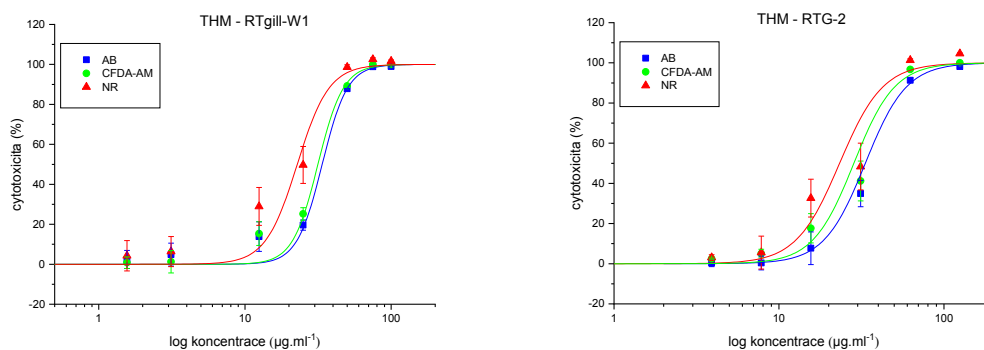
Obr. 12: Toxikologické křivky dávka-odpověď hexadecylpyridinium chloridu pro tkáňovou linii RTgill-W1 (vlevo) a RTG-2 (vpravo)



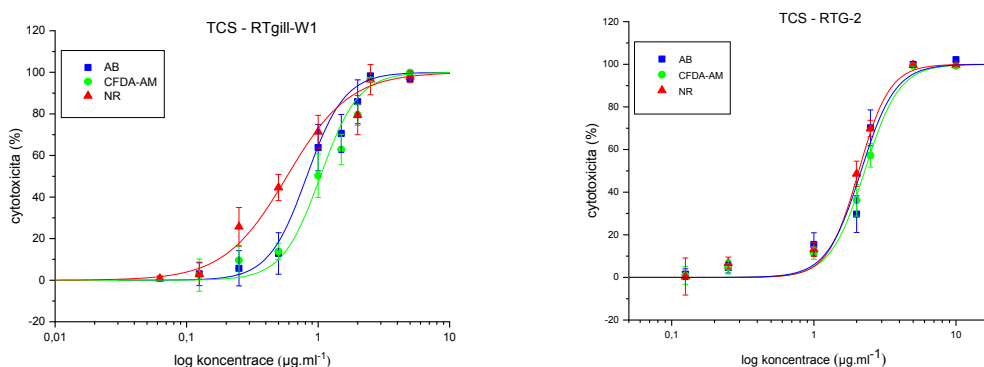
Obr. 13: Toxikologické křivky dávka-odpověď chlorhexidinu pro tkáňovou linii RTgill-W1 (vlevo) a RTG-2 (vpravo)



Obr. 14: Toxikologické křivky dávka-odpověď octenidinu pro tkáňovou linii RTgill-W1 (vlevo) a RTG-2 (vpravo)



Obr. 15: Toxikologické křivky dávka-odpověď thymolu pro tkáňovou linii RTgill-W1 (vlevo) a RTG-2 (vpravo)



Obr. 16: Toxikologické křivky dávka-odpověď triclosanu pro tkáňovou linii RTgill-W1 (vlevo) a RTG-2 (vpravo)

Mezi základní parametry toxikologických křivek dávka-odpověď patří kromě minima, maxima (které byly nastaveny jako 0 a 100) a hodnoty EC_{50} i tzv. „HillSlope“, který popisuje strmost dané křivky. Těmto křivkám se jinak říká také čtyřparametrické logistické křivky, zkráceně 4PL. Proměnná „HillSlope“ se nazývá Hillův sklon, faktor sklonu nebo také Hillův koeficient a nemá žádné jednotky. Pokud je tento koeficient kladný, křivka narůstá se zvyšujícím se X. Pokud je koeficient záporný, křivka klesá s rostoucím X. Standardní sigmoidní křivka má HillSlope 1. Pokud je HillSlope menší než 1, křivka je mělká, při HillSlope větší než 1 křivka vzrůstá strměji (GraphPad Curve Fitting Guide). Přehled faktorů sklonu pro všechny uvedené křivky z obr. 12 – 16 je uveden v tabulce 2.

Tabulka č. 2: Přehled Hillových koeficientů pro výše uvedené toxikologické křivky dávka-odpověď (obr. 12 – 16)

Látka	Křivka	RTgill-W1	RTG-2
HDP	AB	1,91	1,36
	CFDA-AM	1,61	1,11
	NR	3,25	1,79
CHX	AB	2,46	1,58
	CFDA-AM	2,91	1,32
	NR	3,89	1,51
OCT	AB	1,71	3,09
	CFDA-AM	1,69	3,11
	NR	3,01	2,81
THM	AB	5,03	3,47
	CFDA-AM	5,01	3,51
	NR	4,51	3,31
TCS	AB	3,02	2,99
	CFDA-AM	3,02	2,99
	NR	1,82	3,01

Sklon křivky je důležitý k odhadu toxicity dané látky. Toxicita látek může být porovnávána na základě hodnot EC_{50}/LC_{50} , ale důležité je sledovat i sklon křivky dávka-odpověď. Toxikant s mírným sklonem může být nebezpečnější již při nízkých koncentracích, i když EC_{50}/LC_{50} je vyšší. Podle sklonu křivky je možné vypočítat i NOEC (Moffett et al., 2015).

Porovnání *in vitro* - *in vivo*

Buněčné linie jsou podle vícero publikací považovány za méně citlivé v porovnání s živými rybami a tento rozdíl je tím větší, čím je chemikálie pro zmíněné organismy více toxická (Kramer et al., 2009, Segner, 2004). Tannenberger et al. (2013) zaznamenali, že u tkáňové linie RTG-2 byly ryby pro všechny testované chemikálie vyhodnoceny jako sensitivnější oproti tkáňové linii, zatímco u RTgill-W1 byly ryby vyhodnoceny jako sensitivnější pouze pro 66 % testovaných xenobiotik. Záleží však na vlastnostech a způsobu účinku dané chemikálie, to lze odvodit např. z chemické struktury látky (Bradbury, 1994).

Výsledné hodnoty EC₅₀ byly na základě publikace Tanneberger et al. (2013), kde byly hodnoty EC₅₀ porovnávány s akutními testy toxicity *in vivo*, přepočteny na teoretické hodnoty LC₅₀ podle rovnice:

$$\log EC_{50} (\text{mg.l}^{-1}) = 1,05 (\pm 0,18) \times \log LC_{50} (\text{mg.l}^{-1}) + 0,37 (\pm 0,18))$$

Po predikci LC₅₀ je rozdíl mezi EC₅₀ a získanými hodnotami LC₅₀ jeden až třináásobný u 77 % testů. Největší rozdíl je zaznamenán u HDP u linie RTgill-W1, kde rozdíl dosahuje až osmnáctinásobku. Pouze u jedné hodnoty (HDP, linie RTG-2) dosahuje výsledná LC₅₀ záporných čísel, neboť EC₅₀, která je výchozím bodem pro výpočet, je nižší, než je pro rovnici nutné (nejnižší možná hodnota k výpočtu je 0,37). Záporné číslo tedy vzniká početním úkonem. Tabulka 3 sumarizuje přehled predikovaných hodnot LC₅₀.

Tabulka 3: Predikce hodnot LC₅₀ (v µg.ml⁻¹) spolu se směrodatnou odchylkou (SD) podle Tanneberger et al. (2013)

Látka	Buněčná linie	AB	CFDA-AM	NR
HDP	RTgill-W1	0,03 (±0,25)	0,09 (±0,25)	0,38 (±0,26)
	RTG-2	0,14 (±0,25)	0,19 (±0,25)	-0,16 (±0,25)
CHX	RTgill-W1	3,37 (±0,58)	3,05 (±0,54)	1,58 (±0,35)
	RTG-2	3,36 (±0,61)	2,7 (±0,49)	1,51 (±0,34)

OCT	RTgill-W1	0,25 ($\pm 0,25$)	0,32 ($\pm 0,25$)	0,37 ($\pm 0,26$)
	RTG-2	0,72 ($\pm 0,27$)	0,51 ($\pm 0,26$)	0,32 ($\pm 0,26$)
THM	RTgill-W1	31,77 ($\pm 4,97$)	29,69 ($\pm 4,64$)	21,03 ($\pm 3,34$)
	RTG-2	31,41 ($\pm 4,91$)	26,69 ($\pm 4,18$)	21,79 ($\pm 3,41$)
TCS	RTgill-W1	0,32 ($\pm 0,26$)	0,53 ($\pm 0,26$)	0,09 ($\pm 0,25$)
	RTG-2	1,59 ($\pm 0,35$)	1,71 ($\pm 0,37$)	1,52 ($\pm 0,35$)

Tyto predikované hodnoty by mohly sloužit ke srovnání s koncentracemi, které jsou detekované v životním prostředí a zhodnotit tak možný toxický vliv na ryby. Např. TCS je běžně detekován v povrchových vodách a to v koncentracích do 4 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a v mořské vodě do 0,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Dhillon et al., 2015). Predikované hodnoty LC_{50} se pohybovaly od 90 do 1 710 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Vzhledem k tomu, že hodnota LC_{50} představuje koncentraci, která způsobuje letalitu u 50 % testovaných organismů, by bylo vhodnější s reálnými koncentracemi srovnávat spíše nejnižší koncentraci, která způsobuje nějaký efekt (LOEC) nebo NOEC než právě LC_{50} . Uvedená rovnice použitá k přepočtu EC_{50} na LC_{50} je však určena pro přepočet těchto dvou hodnot. O možnosti užití pro např. EC_{05} , která by mohla teoreticky představovat LOEC, není v publikaci žádná zmínka, proto byla rovnice použita k predikci LC_{50} tak, jako je tomu ve výchozí publikaci Tanneberger et al. (2013), a uvedené srovnání s reálnými koncentracemi je spíše pro představu.

5.2 EROD

Získaná data jsou měřena na buněčné linii RTgill-W1 v jednotkách $\text{pmol.mg proteinu.min}^{-1} \pm \text{SD}$. Koncentrace buněk byla oproti ostatním testům zdvojnásobena na 100 000 buněk ve 100 μl , neboť nižší počet buněk nevykazoval dostatečnou odezvu pro vyhodnocení testu. Upraveno bylo i třepání destičky po přidání fluorescamin/acetónitrilového roztoku. Testováno bylo měření fluorescence bez třepání destičky, poté s třepáním v intervalech po 5 minutách od 5 do 30 minut. V pokusu bez

třepání destičky nedošlo k dostatečnému promíchání roztoku s buňkami a výsledky pak byly v rámci paralel velmi rozdílné. Výsledky v třepaných destičkách se od 10 minut třepání velmi nelišily, proto bylo jako finální vybráno třepání destičky po dobu 10 minut.

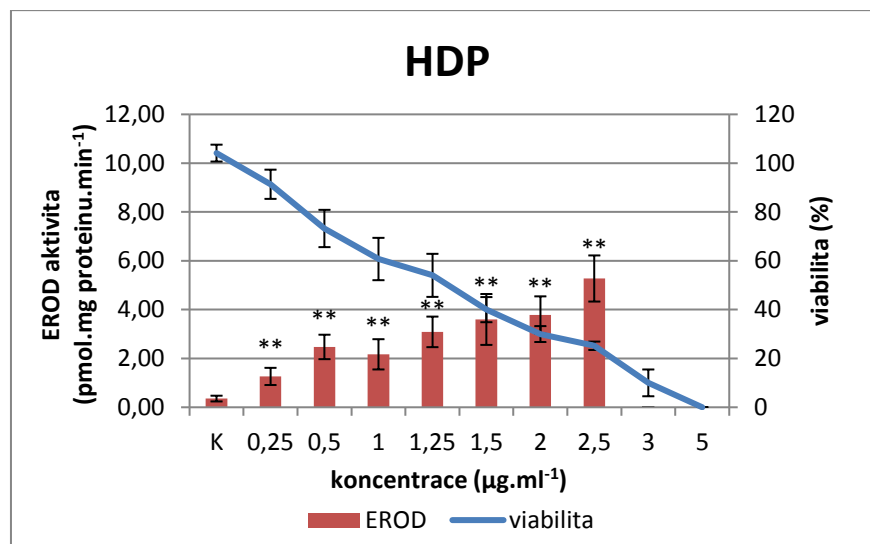
Pro posouzení výsledků EROD je nezbytné výsledky viability zohlednit, neboť je důležité znát množství životaschopných buněk na konci experimentu. V grafech je tedy vyjádřen nárůst EROD aktivity oproti kontrolnímu měření bez toxikantu spolu s viabilitou sledované látky. Pokud dvě po sobě jdoucí koncentrace byly vyhodnoceny jako statisticky významné oproti kontrolní skupině nebo nižší koncentraci, byla u této látky předpokládána indukce cytochromu P450 1A a na základě toho byla látka označena jako tzv. EROD pozitivní. Opakem je označení látky jako EROD negativní.

Vlivem výpočtu vznikají vysoké odpovědi u vyšších koncentrací (viz obr. 19), kde už se viabilita buněk pohybuje kolem 20 %. To je způsobeno tím, že při nízké životaschopnosti buněk se v jednotlivých jamkách nachází jen malé množství proteinu. Množství resorufinu je ale stále poměrně vysoké a při výpočtu k získání jednotek ($\text{pmol.mg proteinu.min}^{-1}$) vzniká vysoké, pro nízkou viabilitu, nelogické číslo. V grafech jsou však tato data ponechána, aby výpočty zůstaly bez zásahů a úprav. U nejvyšších koncentrací nebylo detekováno žádné množství proteinů, ve výpočtu se tedy dělí 0 a odezva nevzniká.

U všech chemikálií kromě TCS byl zaznamenán statisticky významný nárůst EROD aktivity. Nejvyšší odpověď byla zaznamenána u HDP.

Hexadecylpyridinium chlorid

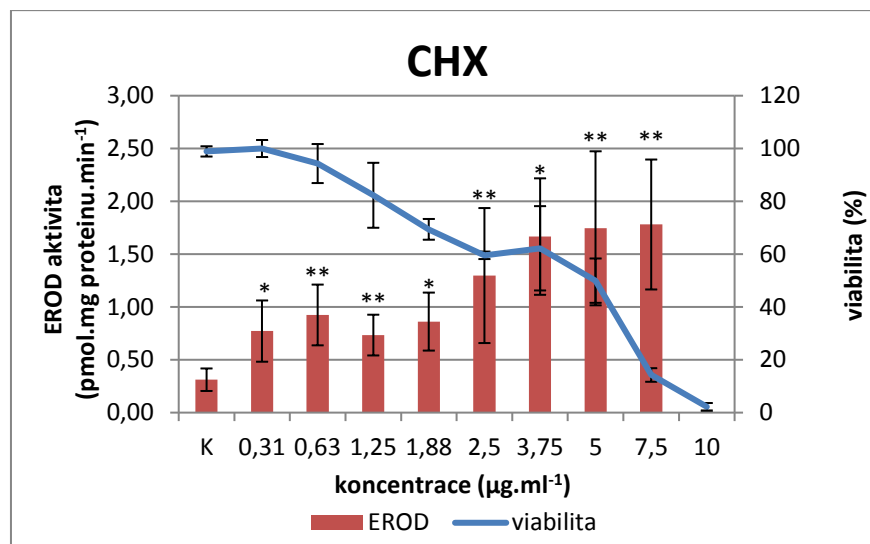
Byly testovány koncentrace od 0,25 do 5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Z vybraných látek vykazuje největší odezvu EROD aktivity. Maxima EROD aktivity bylo dosaženo při koncentraci 2,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, v této koncentraci však viabilita dosahovala maximálně 25 %, takže tuto odpověď není možné počítat za relevantní. Odezvy však byly v celém rozsahu měřených hodnot statisticky významné, a to v intervalu spolehlivosti 99 %. HDP tedy bylo označeno za látku EROD pozitivní, viz obr. 17. V dostupné literatuře bohužel nejsou žádná data k porovnání výsledků.



Obr. 17: Vyjádření EROD produkce po expozici hexadecylpyridinum chloridu (* - $p \leq 0,05$, ** - $p \leq 0,01$)

Chlorhexidin

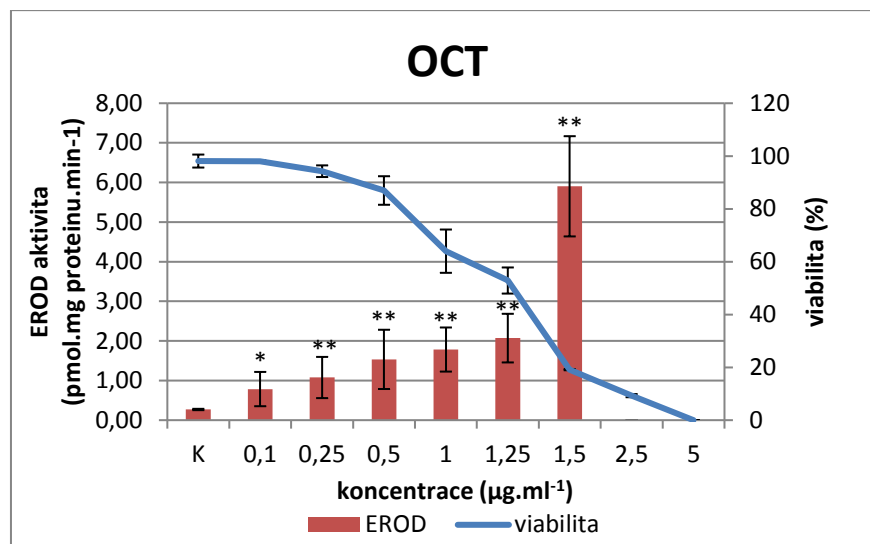
Byly testovány koncentrace od 0,31 do 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Všechny získané hodnoty (kromě nejvyšší koncentrace, kdy byla viabilita buněk nulová) vykazovaly statistickou odlišnost od kontroly. Maximální odezva EROD byla naměřena při koncentraci 7,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, kdy už se viabilita buněk pohybovala pod 20 %. Především koncentrace však vykazují srovnatelnou odezvu a životaschopnost buněk se u těchto koncentrací pohybuje okolo 50 % oproti kontrole, viz obr. 18. CHX byl označen jako EROD pozitivní. V dostupné literatuře nejsou data vhodná k porovnání výsledků.



Obr. 18: Vyjádření EROD produkce po expozici chlorhexidinu (* - $p \leq 0,05$, ** - $p \leq 0,01$)

Octenidin

Byly testovány koncentrace od $0,1$ do $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Koncentrace v rozmezí $0,1$ až $1,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ vykazovaly odezvu, která byla statisticky významná v porovnání s kontrolou. Nepočítáme-li koncentraci $1,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, kde sice bylo vypočítáno maximum odezvy EROD, ale viabilita v tomto bodě byla příliš nízká, nachází se maximum v koncentraci $1,25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, kde se viabilita pohybovala kolo 50% , viz obr. 19. I tato látka může být označena jako EROD pozitivní. V dostupné literatuře nejsou žádné výsledky zabývající se touto chemikálií ve vztahu k aktivitě cytochromu P450.

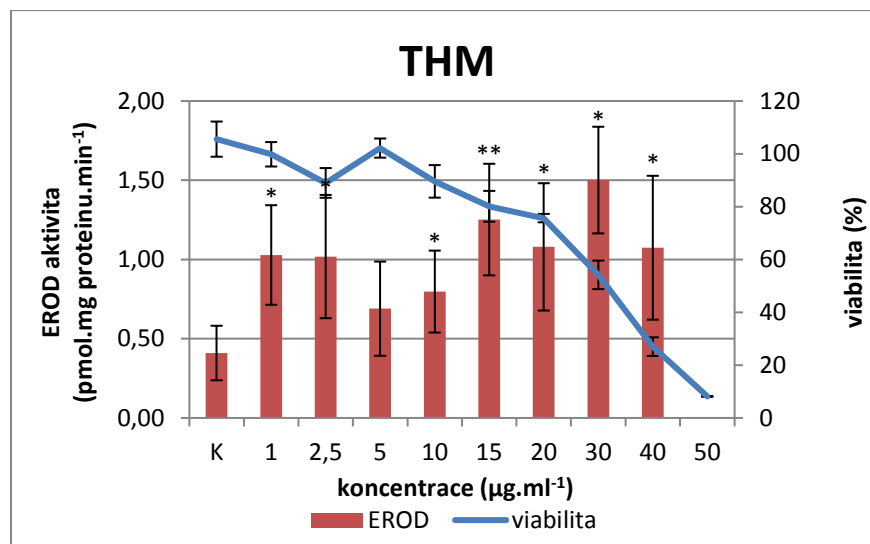


Obr. 19: Vyjádření EROD produkce po expozici octenidinu (* - $p \leq 0,05$, ** - $p \leq 0,01$)

Thymol

Byly testovány koncentrace v rozsahu od 1 do 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Kromě koncentrace 5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ a 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, kde odezva nevznikla z důvodu viability blíží se nule, prokázaly všechny odezvy statistickou významnost. Nejvyšší aktivita EROD byla naměřena při koncentraci 30 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, kde se rovnala až trojnásobku odezvy naměřené v kontrolním měření, viz obr. 20. THM tedy může být označen jako látka EROD pozitivní.

Podle publikace Waliwitiya et al. (2012) thymol inhibuje aktivitu cytochromu P450 o zhruba 5 – 25 % po 16hodinové expozici. Experiment byl proveden s larvami *Aedes aegypti*. V dostupné literatuře bohužel není mnoho experimentů zabývajících se vlivem thymolu na aktivitu cytochromu P450.

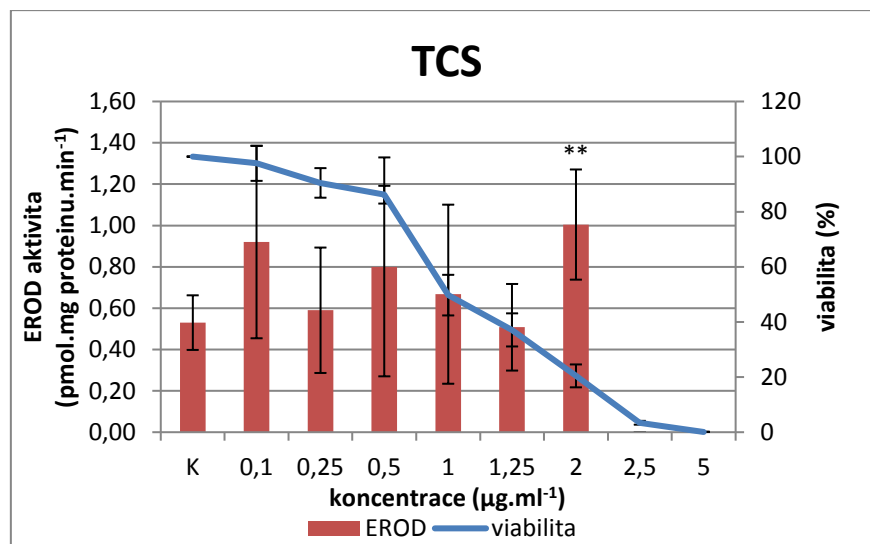


Obr. 20: Vyjádření EROD produkce po expozici thymolu (* - $p \leq 0,05$, ** - $p \leq 0,01$)

Triclosan

Byly testovány koncentrace v rozmezí $0,1 - 5 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Efekt triclosanu na EROD produkci vykazoval jedinou statistickou rozdílnost v koncentraci $2 \mu\text{g.ml}^{-1}$, přičemž při této koncentraci už se viabilita pohybuje okolo pouhých 20 % oproti kontrolní skupině. Tato chemikálie je tedy jako jediná z vybraných toxikantů označena jako EROD negativní (viz obr. 21).

Podle publikace Peng et al. (2014) TCS indukoval tvorbu EROD po 6hodinové expozici u *Daphnia magna*. Nicméně po 24 hod expozici byla aktivita cytochromu P450 inhibována u všech testovaných koncentrací. Hanioka et al. (1996) uvádí, že akutní expozice triclosanu způsobila inhibici EROD v jaterních mikrozomech potkana. Bylo zaznamenáno, že TCS může mít přímý účinek na mitochondrie, zejména narušení fluidity mitochondriální membrány při dlouhodobé expozici (Newton et al., 2005).



Obr. 21: Vyjádření EROD produkce po expozici triclosanu (* - $p \leq 0,05$, ** - $p \leq 0,01$)

Buněčná linie RTgill-W1 je sice jednou z citlivějších linií pstruha duhového, avšak pro tento test by bylo vhodnější použít např. linii izolovanou z jater RTL-W1, která by pravděpodobně ukazovala dostatečnou odezvu i při nižší koncentraci buněk jako tomu bylo v publikaci Kienzler et al. (2012) nebo Franco et al. (2018). Některé látky, AhR agonisti, však mohou být metabolizovány dříve, než se dostanou do jater. Nicméně je možné měřit EROD aktivitu ve tkáni, která je přímo vystavená vodě, jako jsou právě žábry (Levine and Oris, 1999). Žábry jsou přímo vystaveny polutantům vyskytujícím se ve vodním prostředí a jsou důležitým místem absorpce znečišťujících látek do těla. Agonisté AhR indukují CYP1A právě v rybích žábrách (Jönsson et al., 2004).

Bohužel nebylo možné v dostupné literatuře najít více experimentů věnující se těmto látkám a jejich vlivu na zvýšení aktivity cytochromu P450 1A. Nebylo tedy možné výsledky náležitě porovnat s jinými relevantními daty.

5.3 ROS

Studium oxidačního stresu je důležitou kapitolou v oblasti ekotoxikologie a toxikologie vůbec. Dá se totiž považovat za možnost detekce kontaminace prostředí, za předpokladu, že se prokáže souvislost mezi xenobiotikem, které vyvolává oxidační změny a výskytem typických markerů oxidačního poškození. Tento fakt je významný pro posouzení zdravotního stavu ryb, jež jsou součástí lidského potravního řetězce (Lushchak, 2011).

Získaná data jsou měřena na buněčné linii RTgill-W1. Výsledné hodnoty byly vyjádřeny jako průměr 3 paralelních měření spolu se směrodatnými odchylkami. V grafech je vyjádřena procentuální změna ROS po 2 hodinách expozice toxikantu vztažena k tzv. solvent kontrole (kontrola vlivu rozpouštědla). Ze škály měřených časových intervalů: čas 0, 30 min, 60 min, 90 min, 2 h, 4 h, 6 h a 24 h byl vybrán pro interpretaci výsledků čas 2 h, neboť u všech látek bylo dosaženo maxima. Pro posouzení ROS je klíčová životaschopnost buněk, protože snížení počtu životaschopných buněk může ovlivnit tvorbu ROS. Byla tedy měřena viabilita po 2 hodinách expozice (data nejsou zobrazena, pouze diskutována u příslušného toxikantu). Grafy byly vytvořeny ve statistickém software Microsoft Excel (2007).

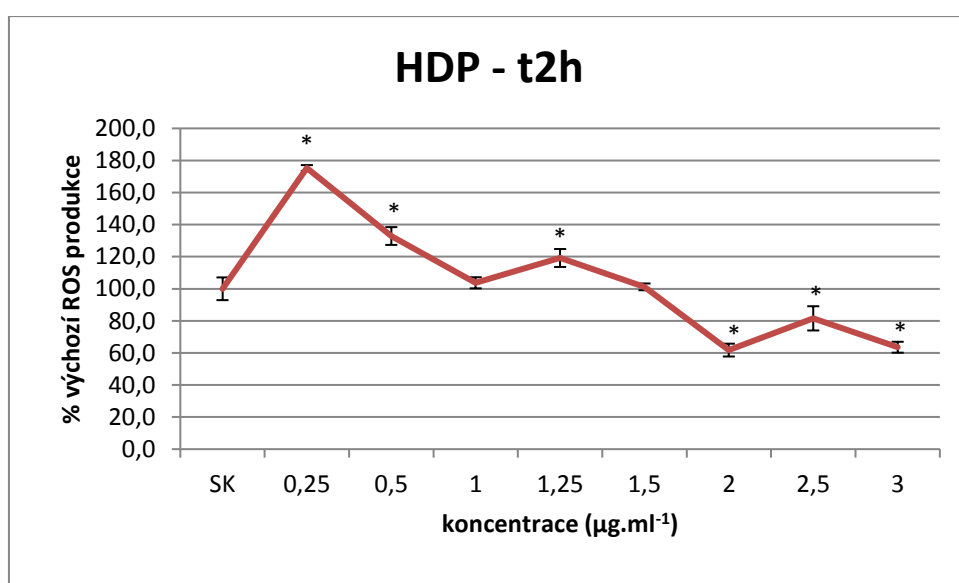
Podle Manzl et al. (2004) je DMSO potencionálním „vychytávačem“ ROS. To bylo ale na základě experimentů publikace Bopp et al. (2008) vyhodnoceno jako statisticky nevýznamné.

Obecně platí, že expozice organismů kontaminantům, které vytvářejí ROS, vede k indukci nebo k inhibici antioxidantních enzymů. Díky tomu se využívá indikace enzymů, které se do antioxidantního systému zapojují, ke studiu expozice znečišťujících látek (Peng et al., 2013). U ryb je oxidační stres většinou studován při kontaminaci životního prostředí znečišťujícími látky, např. těžkými kovy nebo pesticidy. Oxidační stres u ryb je závislý na několika faktorech, které mohou oxidační stres indukovat; teplota, hladina rozpuštěného kyslíku ve vodě, salinita, přítomnost kovových iontů, potrava a další (Lushchak, 2011).

Hexadecylpyridinium chlorid

Byly testovány koncentrace od 0,25 do 3 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Maxima ROS produkce bylo dosaženo v koncentraci 0,25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, poté křivka produkce klesá. Koncentraci 2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a následné vyšší koncentrace se jeví jako inhibiční (viz obr. 22), ale viabilita v této koncentraci po 2 hodinách expozice dosahovala zhruba 30 % oproti kontrolnímu měření. Pokles křivky mohl být způsoben právě nízkým počtem životaschopných buněk, takže této části křivky již není věnován zřetel.

HDP bylo vyhodnoceno na základě hodnoty EC_{50} jako nejvíce toxickou látkou ze všech testovaných chemikálií. Vysoká toxicita by mohla být zprostředkována právě vysokou produkcí ROS, ke které dochází v nižších koncentracích (Laville at al., 2004).

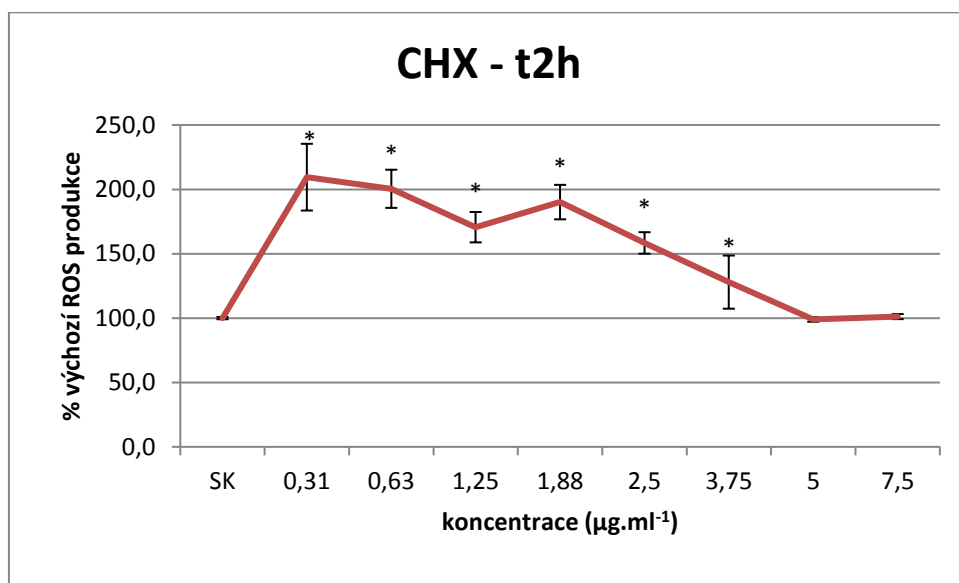


Obr. 22: Produkce ROS po 2hodinové expozici hexadecylpyridinium chloridu (* - $p \leq 0,05$)

Chlorhexidin

Byly testovány koncentrace od 0,31 do 7,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Viabilita po 2 hodinové expozici neklesla u žádné z koncentrací, kromě nejvyšší, pod 70 %. Maxima ROS produkce bylo dosaženo v koncentraci 0,31 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, poté křivka klesala, ale i tak je produkce statisticky významná až do koncentrace 3,75 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (viz obr. 23). Nejvyšší produkce ROS tedy docházelo spíše při nižších koncentracích.

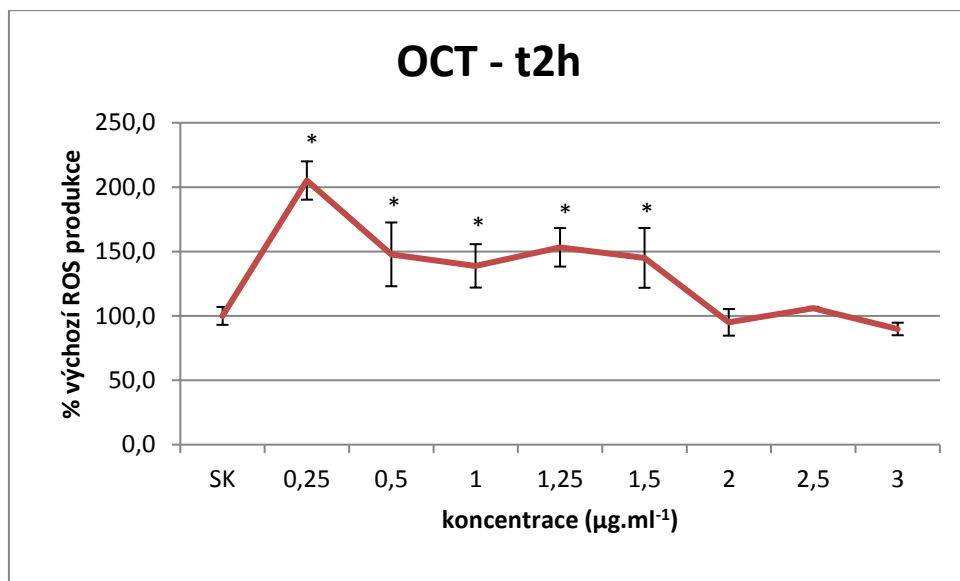
Podle experimentu Yeung et al. (2007) chlorhexidin vykazuje jak antioxidační tak prooxidační vlastnosti, a to v závislosti na podmínkách, zejména bylo testováno zásadité prostředí. Tento výzkum se však týká periodontálních mikroorganismů. Studie Li et al. (2014) uvádí, že CHX indukuje superoxidové anionty, podobné výsledky uvádí i Gianelli et al. (2008), kteří uvádí indukci ROS u osteoblastické buněčné linie Saos-2. Publikace Gümüs et al. (2016) uvádí, že CHX snižuje hladinu oxidativního stresu. Testovanou matricí v tomto experimentu byla sliznice potkana.



Obr. 23: Produkce ROS po 2hodinové expozici chlorhexidinu (* - $p \leq 0,05$)

Octenidin

Byly testovány koncentrace od 0,25 do 3 µg.ml⁻¹. Statisticky významné byly výsledky u koncentrací 0,25 – 1,5 µg.ml⁻¹, u nichž životaschopnost buněk dosahovala u nejvyšší z tohoto rozsahu koncentrací 55 %. Od koncentrace 2 µg.ml⁻¹ se produkce snižovala a výsledky už neprokazovaly statistickou významnost (obr. 24). Octenidin může být označen za chemikálii indukující ROS. V dostupné literatuře se nevyskytují data k porovnání těchto výsledků.

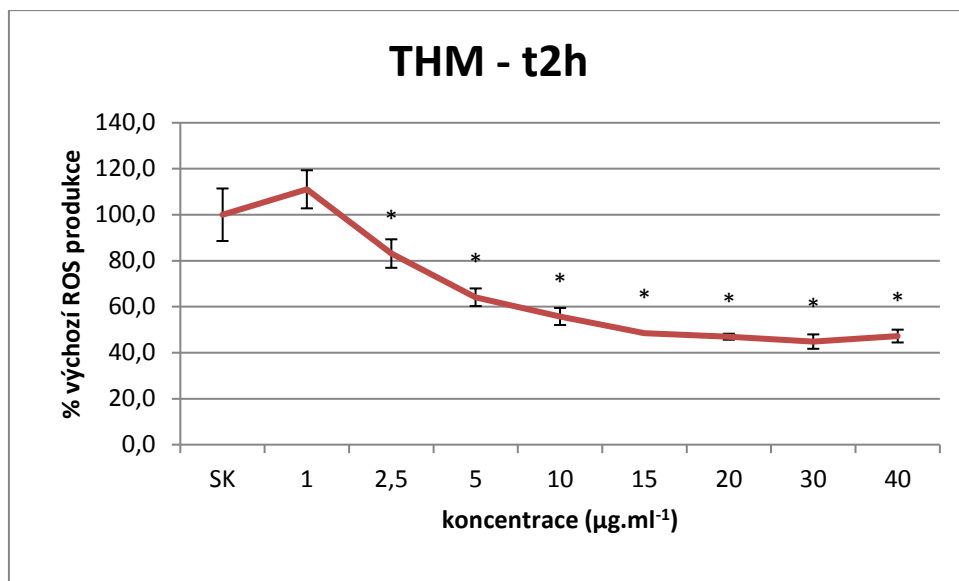


Obr. 24: Produkce ROS po 2hodinové expozici octenidinu (* - $p \leq 0,05$)

Thymol

Byly testovány koncentrace v rozsahu 1 – 40 µg.ml⁻¹. Křivka klesá v celém svém rozsahu a kromě nejnižší koncentrace v řadě jsou všechny hodnoty statisticky významné od kontroly (viz obr. 25) Životaschopnost buněk po 2 hodinách expozice se v celém rozsahu koncentrační řady pohybuje mezi 70-100 %. Tato chemikálie tedy nemůže být označena za induktor tvorby ROS.

Thymol působí proti oxidativnímu stresu, tedy jako antioxidant, který je nezbytný pro inhibici tvorby nebo destrukci volných radikálů, čímž zabraňuje škodlivým účinkům ROS (Úndeđer et al., 2009, Mohammadi et al., 2018). Antioxidační účinky THM potvrzuje i Jamali et al. (2018).

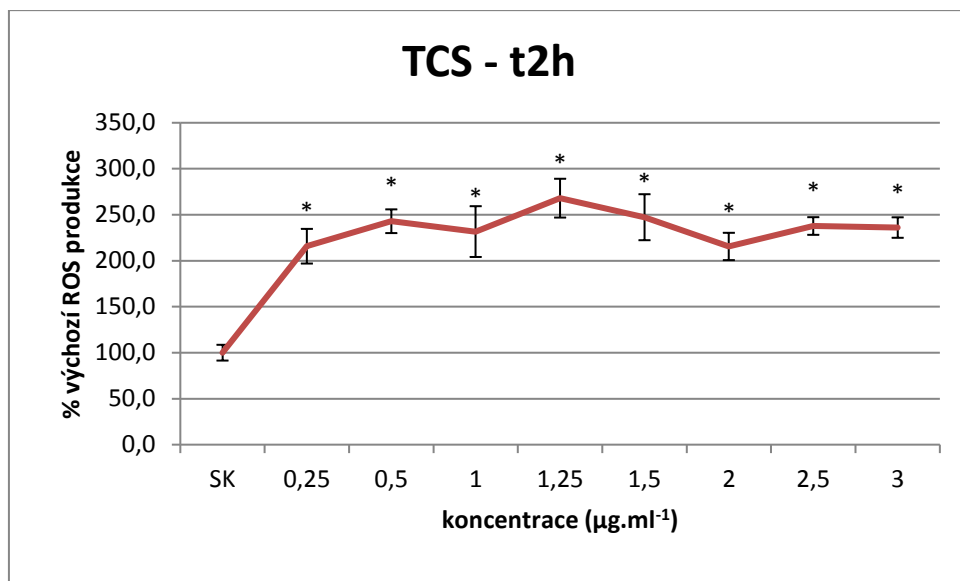


Obr. 25: Produkce ROS po 2hodinové expozici thymolu (* - $p \leq 0,05$)

Triclosan

Byly testovány koncentrace v rozmezí 0,1 – 5 µg.ml⁻¹. TCS je látkou, která podle literatury u organismů indukuje tvorbu ROS (Wang et al., 2017, Parenti et al., 2019). Zároveň je TCS látkou, která ze všech testovaných chemikálií indukuje největší množství ROS. Maximum produkce ROS bylo dosaženo při koncentraci 1,25 µg.ml⁻¹, což odpovídá 2,6 násobku kontrolního měření (viz obr. 26). TCS je jediný z testovaných látek, kde nebyl zachycen pokles tvorby ROS u vyšších prokazatelně toxických koncentrací. Viabilita po 2 hodinách expozice triclosanu dosahuje minimálně 70 % u koncentrace 1,5 µg.ml⁻¹, dále klesá k 40 % viability u koncentrace 2,5 µg.ml⁻¹. U nejvyšší koncentrace už je viabilita zanedbatelná. Triclosan je tedy možné hodnotit jako induktor tvorby ROS.

Ošetření TCS vede ke zvýšení ROS u nervových kmenových buněk potkana (Park et al., 2016). TCS také zvyšuje hladinu ROS v neokortikálních neuronech u myši spolu s narušenou regulací cytochromů P450 1A (Szychowski et al., 2019).



Obr. 26: Produkce ROS po 2hodinové expozici triclosanu (* - $p \leq 0,05$)

6 Závěr

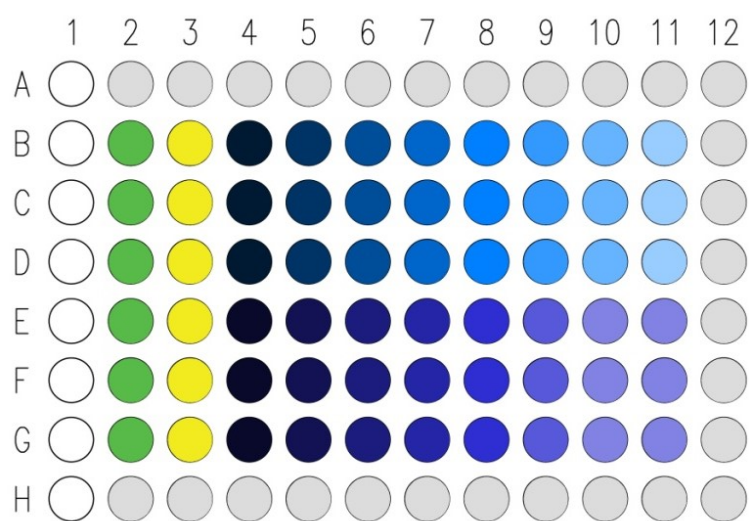
Cílem této práce bylo zhodnotit cytotoxicitu, EROD aktivitu a vliv na tvorbu ROS u pěti relevantních chemikálií ze skupiny látek PCPs. Mezi hlavní výsledky této práce patří: určení hodnoty EC_{50} vybraných polutantů u dvou tkáňových linií, přičemž byla využita metoda kombinující hodnocení tří nezávislých a principiálně odlišných indikátorových barviv pro sledování životaschopnosti buněk (metabolická aktivita, membránová integrita a membránová integrita lyzozomů) a následná predikce LC_{50} pro živé ryby. Výsledky životaschopnosti buněk ukazují, že tkáňová linie RTgill-W1 izolovaná ze žaber je u testovaných látek citlivější než linie RTG-2 izolovaná z gonád. Nejvíce toxickou látkou byl HDP a nejméně toxickou THM.

EROD aktivita byla zaznamenána u čtyř (HDP, CHX, OCT, THM) z pěti testovaných chemikálií, které byly označeny jako tzv. EROD pozitivní. Největší odezva byla zaznamenána u HDP, kde u relevantních odpovědí dosahovala aktivita EROD až osminásobku vůči kontrole.

Tvorbu ROS indukovali čtyři (HDP, CHX, OCT, TCS) z pěti testovaných látek, přičemž největší oxidační stres byl zaznamenán u TCS. U THM byla prokázána statisticky významná antioxidační účinnost proti tvorbě ROS.

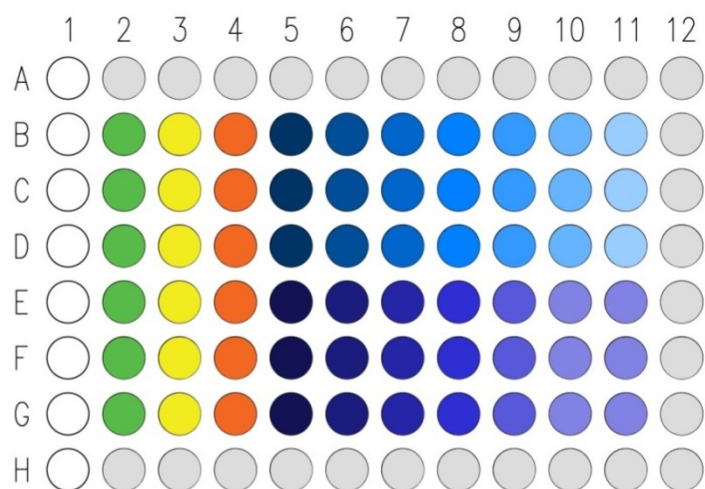
Vzhledem k tomu, že v dostupné literatuře chybí publikace a experimenty věnující se chemikáliím ze skupiny PCPs, a to zejména na rybách jako testovaných organismech, jsou poznatky z této práce zcela novými informacemi a jistým přínosem pro studium ekotoxikologie a životního prostředí.

Příloha 1



- kontrola expozičního média (L-15/ex) s buňkami
- kontrola 0,1% DMSO s buňkami
- pozadí bez buněk
- koncentrační řada toxikantu s buňkami

Příloha 2



- kontrola expozičního média (L-15/ex) s buňkami
- kontrola 0,1% DMSO s buňkami
- pozadí bez buněk
- koncentrační řada toxikantu s buňkami
- pozitivní kontrola s buňkami

Použitá literatura

Ahn, K. C., Zhao, B., Chen, J., Cherednichenko, G., Sanmarti, E., Denison, M. S., Lasley, B., Pessah, I. N., Kültz, D., Chang, D. P. Y., Hammock, B. D., Gee, S. J. In vitro biologic activities of the antimicrobials triclocarban, its analogs, and triclosan in bioassay screens: receptor-based bioassay screens. *Environmental health perspectives*, 116(9), 1203, 2008.

Armstrong, J. S., Steinauer, K. K., Hornung, B., Irish, J. M., Lecane, P., Birrell, G. W., Peehl, D. M., Knox, S. J. Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line. *Cell death and differentiation*, 9(3), 252, 2002.

Asadoorian, J., Williams, K. B. Cetylpyridinium chloride mouth rinse on gingivitis and plaque. *American Dental Hygienists' Association*, 82(5), 42-42, 2008.

Aslantürk, Ö. S. *In Vitro* Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages (Vol. 2, p. 64). *InTech*, 2018.

Bhanushali, M., Bagale, V., Shirode, A., Joshi, Y., Kadam, V. An in-vitro toxicity testing-a reliable alternative to toxicity testing by reduction, replacement and refinement of animals. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences*, 1(1), 2010.

Biospherix. Cyto-centric Blog. Temperature, CO₂, and pH in Cell Culture Media [online]. NY, Parish: Biospherix, ©2019. [Cit. 16.10.2019]. Dostupné z: <https://www.biospherix.com/blog/temperature-co2-and-ph-in-cell-culture-media>

Bols, N. C., Barlian, A., Chirino-Trejo, M., Caldwell, S. J., Goegan, P., Lee, L. E. J. Development of a cell line from primary cultures of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), gills. *Journal of Fish Diseases*, 17(6), 601-611, 1994.

Bols, N. C. and Lee, L. E. J. Technology and uses of cell cultures from the tissues and organs of bony fish. *Cytotechnology* 6, 163–187, 1991.

Bols, N. C., Dayeh, V. R., Lee, L. E. J., Schirmer, K.. Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. In: Mohn, T.W., Mommsen, T.P. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology and Fisheries* 6, 43–84, 2005.

Bopp, S. K., Abicht, H. K., Knauer, K. Copper-induced oxidative stress in rainbow trout gill cells. *Aquatic toxicology*, 86(2), 197-204, 2008.

Borenfreund, E., Puerner, J. A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays. *Journal of tissue culture methods*, 9, 7-12, 1984.

Borenfreund, E., Puerner, J. A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology letters*, 24(2-3), 119-124, 1985.

Bradbury, S. P. Predicting modes of toxic action from chemical structure: an overview. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 2(1-2), 89-104, 1994.

Biologie a genetika pro bakaláře [online]. Buněčné a tkánové kultury. Česká republika: Fakulta veterinární hygieny a ekologie ©2014. [Cit. 20.7.2019]. Dostupné z: https://cit.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-bunecne_a_tkanove_kultury&lang=cz

Cameron, G. Tissue culture technique. Academic Press Inc., Publishers; New York. 1950.

Caminada, D., Escher, C., Fent, K.. Cytotoxicity of pharmaceuticals found in aquatic systems: comparison of PLHC-1 and RTG-2 fish cell lines. *Aquatic toxicology*, 79(2), 114-123, 2006.

Cizmas, L., Sharma, V. K., Gray, C. M., McDonald, T. J. Pharmaceuticals and personal care products in waters: occurrence, toxicity, and risk. *Environmental Chemistry Letters*, 13(4), 381-394, 2015.

Coogan, M. A., Edziyie, R. E., La Point, T. W., Venables, B. J. Algal bioaccumulation of triclocarban, triclosan, and methyl-triclosan in a North Texas wastewater treatment plant receiving stream. *Chemosphere*, 67(10), 1911-1918, 2007.

Commission of the European Communities [online]. Sixth report on the statistics on the number of animals used for experimental and other scientific purposes in the member states of the European Union, ©2010. [Cit. 16.10.2019]. Dostupné v češtině z: [https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:52010DC0511R\(01\)&from=EN](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:52010DC0511R(01)&from=EN)

Commission of the European Communities [online]. Seventh report on the statistics on the number of animals used for experimental and other scientific purposes in the member states of the European Union. ©2013. [Cit. 7.12.2019]. Dostupné v češtině z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:52013DC0859&from=EN>

Connell, D., Lam, P., Richardson, B., Wu, R. Introduction to Ecotoxicology, Oxford, England, *Blackwell Science*, 1999.

Dai, G., Wang, B., Huang, J., Dong, R., Deng, S., Yu, G. Occurrence and source apportionment of pharmaceuticals and personal care products in the Beiyun River of Beijing, China. *Chemosphere*, 119, 1033-1039, 2015.

Daughton, C. G., Ternes, T. A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?. *Environmental health perspectives*, 107(6), 907-938, 1999.

Dayan, A. D. Risk assessment of triclosan [Irgasan] in human breast milk. *Food and chemical toxicology*, 45:125-129, 2007.

Dayeh, V. R., Schirmer, K., Bols, N. C. Applying whole-water samples directly to fish cell cultures in order to evaluate the toxicity of industrial effluent. *Water Research*, 36(15), 3727-3738, 2002.

Dayeh, V. R., Schirmer, K., Lee, L. E., Bols, N. C. Rainbow trout gill cell line microplate cytotoxicity test. In Small-scale freshwater toxicity investigations. *Springer, Dordrecht*, 473-503, 2005.

Dayeh, V. R., Bols, N. C., Tanneberger, K., Schirmer, K., Lee, L. E. The use of fish-derived cell lines for investigation of environmental contaminants: An update following OECD's fish toxicity testing framework No. 171. *Current protocols in toxicology*, 56(1), 1-5, 2013.

De Fries, R., Mitsuhashi, M. Quantification of mitogen induced human lymphocyte proliferation: Comparison of alamarblue™ assay to ³h-thymidine incorporation assay. *Journal of clinical laboratory analysis*, 9(2), 89-95, 1995.

Dhillon, G. S., Kaur, S., Pulicharla, R., Brar, S. K., Cledón, M., Verma, M., Surampalli, R. Y. Triclosan: current status, occurrence, environmental risks and bioaccumulation potential. *International journal of environmental research and public health*, 12(5), 5657-5684, 2015.

Dziezak, J. D. Preservatives: antioxidants. *Food Technoogy*, 40(9), 94-102, 1968.

Eagle, H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*, 122(3168), 501-504, 1955.

Eagri.cz. Ochrana zvířat. Pokusná zvířata [online]. Česká republika: Ministerstvo zemědělství, ©2009 - 2019 [cit. 6.12.2019]. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/file/1454/EPZ_CZ94_18_1.pdf

Echo.europa.eu. Informace o chemických látkách [online]. Finsko: European Chemicals Agency, ©2019 [cit. 15.12.2019]. Dostupné z: <https://echa.europa.eu/hr/registration-dossier/-/registered-dossier/17221/6/2/2>

Eppendorf Handling Solutions. Cell Handling. Everyday Culture Practice [online]. Německo, Hamburk: Eppendorf, ©2019 [cit. 16.10.2019]. Dostupné z: <https://handling-solutions.eppendorf.com/cell-handling/reproducibility/scientific-background/everyday-culture-practice/>

Essig-Marcello, J. S. and Van Buskirk, R. G.. A double-label in situ cytotoxicity assay using the fluorescent probes neutral red and BCECF-AM. *In Vitro Toxicology*. 3, 219- 227, 1990.

Ferrero, M., Castano, A., Gonzalez, A., Sanz, F., Becerril, C. Characterization of RTG-2 fish cell line by random amplified polymorphic DNA. *Ecotoxicology and environmental safety*, 40(1-2), 56-64, 1998.

Fischer, M., Belanger, S. E., Berckmans, P., Bernhard, M. J., Bláha, L., Coman Schmid, D. E., Laue, H., Dyer, S. D., Haupt, T., Hermens, J. L. M., Hultman, M. T., Lilicrap, A., Minaříková, M., Natsch, A., Novák, J., Sinnige, T. L., Tollefsen, K. E., von Niederäusern, V., Witters, H., Županič, A., Schirmer, K. Repeatability and reproducibility of the RTgill-W1 cell line assay for predicting fish acute toxicity. *Toxicological Sciences*, 169(2), 353-364, 2019.

Fryer, J. L. and Lannan, C. N. Three decades of fish cell culture: a current listing of cell lines derived from fishes. *Journal of Tissue Culture Methods*, 16(2), 87-94, 1994.

Ganassin, R. C. and Bols, N. C. Development of long-term rainbow trout spleen cell cultures that are hemopoietic and generate dendritic cells. *Fish & Shellfish Immunology*, 6, 17-34, 1996.

Ganassin, R. C., Schirmer, K., Bols, N. C. Cell and tissue culture. In: Ostrander, G.K. (Ed.), *The Laboratory Fish*. Academic, San Diego, CA, USA, pp. 631–651, 2000.

Giannelli, M., Chellini, F., Margheri, M., Tonelli, P., Tani, A. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: a molecular and ultrastructural investigation. *Toxicology in vitro*, 22(2), 308-317, 2008.

Gloeckner, H., Jonuleit, T., Lemke, H. D. Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye Alamar Blue™. *Journal of immunological methods*, 252(1-2), 131-138, 2001.

GraphPad Curve Fitting Guide. GraphPad software. Equation: Sigmoidal dose-response (variable slope). [online]. Kalifornie, San Diego ©1995-2016 [cit. 28.12.2019]. Dostupné z: https://www.graphpad.com/guides/prism/7/curve-fitting/index.htm?reg_classic_dr_variable.htm

Gümüş, S., Yarıktaş, M., Nazıroğlu, M., Uğuz, A. C., Aynali, G., Başpınar, Ş. Effect of a corticosteroid (triamcinolone) and chlorhexidine on chemotherapy-induced oxidative stress in the buccal mucosa of rats. *ENT: Ear, Nose & Throat Journal*, 95(12), 2016.

Hahn, M. E., Woodward, B. L., Stegeman, J. J., Kennedy, S. W. Rapid assessment of induced cytochrome P4501 a protein and catalytic activity in fish hepatoma cells grown in multiwell plates: Response to TCDD, TCDF, and two planar PCBS. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 15(4), 582-591, 1996.

Halden, R. U., Paull, D., H. Co-occurrence of triclocarban and triclosan in U.S. water resources. *Environmental science & technology*, 39(6), 1420–1426, 2005.

Hammond, M. E., Goodwin, J., Dvorak, H. F. Quantitative measurements of neutral red uptake and excretion by mammalian cells. *Journal of the Reticuloendothelial Society*, 27, 337-346, 1980.

Hanioka, N., Omae, E., Nishimura, T., Jinno, H., Onodera, S., Yoda, R., Ando, M. Interaction of 2, 4, 4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether with microsomal cytochrome P450-dependent monooxygenases in rat liver. *Chemosphere*, 33(2), 265-276, 1996.

Hayflick, L., Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research*, 25(3), 585-621, 1961.

Hu, D., Coats, J. Evaluation of the environmental fate of thymol and phenethyl propionate in the laboratory. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 64(7), 775-779, 2008.

Hübner, N. O., Siebert, J., Kramer, A. Octenidine dihydrochloride, a modern antiseptic for skin, mucous membranes and wounds. *Skin pharmacology and physiology*, 23(5), 244-258, 2010.

Chapple, I. L. C. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *Journal of clinical periodontology*, 24(5), 287-296, 1997.

Chen, X., Zhong, Z., Xu, Z., Chen, L., Wang, Y. 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: forty years of application and controversy. *Free radical research*, 44(6), 587-604, 2010.

Chen, B., Zheng, Z., Yang, J., Chi, H., Huang, H., Gong, H. Development and characterization of a new cell line derived from European eel *Anguilla anguilla* kidney. *Biology open*, 8(1), 2019.

Jamali, T., Kavooosi, G., Safavi, M., Ardestani, S. K. In-vitro evaluation of apoptotic effect of OEO and thymol in 2D and 3D cell cultures and the study of their interaction mode with DNA. *Scientific reports*, 8(1), 15787, 2018.

Jesus, F. T., Oliveira, R., Silva, A., Catarino, A. L., Soares, A. M., Nogueira, A. J., Domingues, I. Lethal and sub lethal effects of the biocide chlorhexidine on aquatic organisms. *Ecotoxicology*, 22(9), 1348-1358, 2013.

Jochems, C. E., Van Der Valk, J. B., Stafleu, F. R., Baumans, V. The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *Alternatives to Laboratory Animals*, 30(2), 219-227, 2002.

Jönsson, M. E., Brunström, B., Ingebrigtsen, K., Brandt, I. Cell-specific CYP1A expression and benzo[a]pyrene adduct formation in gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following CYP1A induction in the laboratory and in the field. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 23(4), 874-882, 2004.

Jönsson, E. M., Abrahamson, A., Brunström, B., Brandt, I. Cytochrome P4501A induction in rainbow trout gills and liver following exposure to waterborne indigo, benzo [a] pyrene and 3, 3', 4, 4', 5-pentachlorobiphenyl. *Aquatic Toxicology*, 79(3), 226-232, 2006.

Jung, D. K., Klaus, T., Fent, K. Cytochrome P450 induction by nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons, azaarenes, and binary mixtures in fish hepatoma cell line PLHC-1. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 20(1), 149-159, 2001.

Kapoor, S., Bhatt, J. P., Lakra, W. S. Development and characterization of a new cell line CF from caudal fin of knifefish, *Chitala chitala* (Hamilton-Buchanan). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 49(9), 728-733, 2013.

Kavooosi, G., Dadfar, S. M. M., Purfard, A. M. Mechanical, physical, antioxidant, and antimicrobial properties of gelatin films incorporated with thymol for potential use as nano wound dressing. *Journal of Food Science*, 78(2), E244-E250, 2013.

Kennedy, S. W., Jones, S. P. Simultaneous measurement of cytochrome P4501A catalytic activity and total protein concentration with a fluorescence plate reader. *Analytical biochemistry*, 222(1), 217-223, 1994.

Kienzler, A., Tronchère, X., Devaux, A., Bony, S. Assessment of RTG-W1, RTL-W1, and PLHC-1 fish cell lines for genotoxicity testing of environmental pollutants by means of a Fpg-modified comet assay. *Toxicology in vitro*, 26(3), 500-510, 2012.

Koburger, T., Hübner, N. O., Braun, M., Siebert, J., Kramer, A. Standardized comparison of antiseptic efficacy of triclosan, PVP-iodine, octenidine dihydrochloride, polyhexanide and chlorhexidine digluconate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(8), 1712-1719, 2010.

Kramer, N. I., Hermens, J. L., Schirmer, K. The influence of modes of action and physicochemical properties of chemicals on the correlation between in vitro and acute fish toxicity data. *Toxicology in vitro*, 23(7), 1372-1379, 2009.

Küng, E., Pietrzak, J., Klaus, C., Walochnik, J. In vitro effect of octenidine dihydrochloride against *Trichomonas vaginalis*. *International journal of antimicrobial agents*, 47(3), 232-234, 2016.

Lakra, W. S., Swaminathan, T. R., Joy, K. P. Development, characterization, conservation and storage of fish cell lines: a review. *Fish physiology and biochemistry*, 37(1), 1-20, 2010.

Lammel, T., Boisseaux, P., Fernández-Cruz, M. L., Navas, J. M. Internalization and cytotoxicity of graphene oxide and carboxyl graphene nanoplatelets in the human hepatocellular carcinoma cell line Hep G2. *Particle and fibre toxicology*, 10(1), 27, 2013.

Laville, N., Ait-Aïssa, S., Gomez, E., Casellas, C., Porcher, J. M. Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. *Toxicology*, 196(1-2), 41-55, 2004.

Lawrence, J. R., Zhu, B., Swerhone, G. D. W., Topp, E., Roy, J., Wassenaar, L. I., Rema, T., Korber, D. R. Community-level assessment of the effects of the broad-spectrum antimicrobial chlorhexidine on the outcome of river microbial biofilm development. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(11), 3541-3550, 2008.

LeBel, C. P., Ischiropoulos, H., Bondy, S. C. Evaluation of the probe 2', 7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical research in toxicology*, 5(2), 227-231, 1992.

Lee, L. E. J., Dayeh, V. R., Schirmer, K., Bols, N. C. Applications and potential uses of fish gill cell lines: examples with RTgill-W1. *Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 45(3-4), 127-134, 2009.

Leibovitz, A. The growth and maintenance of tissue-cell cultures in free gas exchange with the atmosphere. *American journal of hygiene*, 78, 173-180, 1963.

Levine, S. L., Oris, J. T. CYP1A expression in liver and gill of rainbow trout following waterborne exposure: implications for biomarker determination. *Aquatic Toxicology*, 46(3-4), 279-287, 1999.

Lewis, M. R. Sea water as a medium for tissue cultures. *The Anatomical Record*, 10(4), 287-299, 1916.

Li, Y. C., Kuan, Y. H., Lee, T. H., Huang, F. M., Chang, Y. C. Assessment of the cytotoxicity of chlorhexidine by employing an in vitro mammalian test system. *Journal of Dental Sciences*, 9(2), 130-135, 2014.

Lorenzen, A., Kennedy, S. W. A fluorescence-based protein assay for use with a microplate reader. *Analytical biochemistry*, 214(1), 346-348, 1993.

Lushchak, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic toxicology*, 101(1), 13-30, 2011.

Marchese, A., Orhan, I. E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, S. F., Nabavi, S. M., Gortzi, O., Morteza, I. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food chemistry*, 210, 402-414, 2016.

Mazur, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American journal of physiology-cell physiology*, 247(3), C125-C142, 1984.

McClellan, K., & Halden, R. U. Pharmaceuticals and personal care products in archived US biosolids from the 2001 EPA national sewage sludge survey. *Water research*, 44(2), 658-668, 2010.

Millhouse, E., Jose, A., Sherry, L., Lappin, D. F., Patel, N., Middleton, A. M., Pratten, J., Culshaw, S., Ramage, G. Development of an in vitro periodontal biofilm model for assessing antimicrobial and host modulatory effects of bioactive molecules. *BMC Oral Health*, 14(1), 80, 2014.

Moffett, D. B., Mumtaz, M. M., Sullivan Jr, D. W., Fowler, B. A. General Considerations of Dose-Effect and Dose-Response Relationships. In *Handbook on the Toxicology of Metals* (pp. 197-212). *Academic Press*, 2015.

Mohammadi, A., Mahjoub, S., Ghafarzadegan, K., Nouri, H. R. Immunomodulatory effects of Thymol through modulation of redox status and trace element content in experimental model of asthma. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 105, 856-861, 2018.

Newton, A. P. N., Cadena, S. M. S., Rocha, M. E. M., Carnieri, E. G. S., De Oliveira, M. B. M. Effect of triclosan (TRN) on energy-linked functions of rat liver mitochondria. *Toxicology letters*, 160(1), 49-59, 2005.

O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F. Investigation of the Alamar Blue™ Blue Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European journal of biochemistry*, 267(17), 5421-5426, 2000.

OECD. OECD Guideline for Testing of Chemicals. [online]. Paris: Organization for Economic Cooperation and Development, 1992. Test No. 203: Acute Fish Test [cit. 16.10.2019]. Dostupné z: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264069961-en.pdf?expires=1571221942&id=id&accname=guest&checksum=E4334A676EF1301B6C638BB0EBFFAF8D>

Orvos, D. R., Versteeg, D. J., Inauen, J., Capdevielle, M., Rothenstein, A., Cunningham, V. Aquatic toxicity of triclosan. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 21(7), 1338-1349, 2002.

Osowski, H. E. Über aktive zellbewegungen im Explantat von Wirbeltierembryonen. *Development Genes and Evolution*, 38(4), 547-583, 1914.

Östman, M., Lindberg, R. H., Fick, J., Björn, E., Tysklind, M. Screening of biocides, metals and antibiotics in Swedish sewage sludge and wastewater. *Water research*, 115, 318-328, 2017.

Özkan, A., Erdoğan, A. A comparative evaluation of antioxidant and anticancer activity of essential oil from *Origanum onites* (*Lamiaceae*) and its two major phenolic components. *Turkish Journal of Biology*, 35(6), 735-742, 2011.

Pampaloni, F., Reynaud, E. G., Stelzer, E. H. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(10), 839, 2007.

Parenti, C. C., Ghilardi, A., Della Torre, C., Mandelli, M., Magni, S., Del Giacco, L., Binelli, A. Environmental concentrations of triclosan activate cellular defence mechanism and generate cytotoxicity on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Science of The Total Environment*, 650, 1752-1758, 2019.

Park, J. B., Lee, G., Yun, B. G., Kim, C. H., Ko, Y. Comparative effects of chlorhexidine and essential oils containing mouth rinse on stem cells cultured on a titanium surface. *Molecular medicine reports*, 9(4), 1249-1253, 2014.

Park, B. K., Gonzales, E. L. T., Yang, S. M., Bang, M., Choi, C. S., Shin, C. Y. Effects of triclosan on neural stem cell viability and survival. *Biomolecules & therapeutics*, 24(1), 99, 2016.

Payne, J. F., Penrose, W. R. Induction of aryl hydrocarbon (benzo (a) pyrene) hydroxylase in fish by petroleum. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 14(1), 1975.

Peng, Y., Luo, Y., Nie, X. P., Liao, W., Yang, Y. F., Ying, G. G. Toxic effects of triclosan on the detoxification system and breeding of *Daphnia magna*. *Ecotoxicology*, 22(9), 1384-1394, 2013.

Rachlin, J. W., Perlmutter, A. Fish cells in culture for study of aquatic toxicants. *Water Research*, 2(6), 409-414, 1968.

Reinhart, B., Lee, L. E. Integrin-like substrate adhesion in RTG-2 cells, a fibroblastic cell line derived from rainbow trout. *Cell and tissue research*, 307(2), 165-172, 2002.

Ruszkiewicz, J. A., Li, S., Rodriguez, M. B., Aschner, M. Is Triclosan a neurotoxic agent?. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 20(2), 104-117, 2017.

Sarasquete, C., Munoz-Cueto, J. A., Ortiz Delgado, J. B., Rodriguez-Gomez, F. J., Dinis, M. T., Segner, H. Immunocytochemical distribution of cytochrome P4501A CYP1A in developing gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Histology and histopathology* 14, 407-415, 1999.

Sedlock, D. M., Bailey, D. M. Microbicidal activity of octenidine hydrochloride, a new alkanediylbis [pyridine] germicidal agent. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 28(6), 786-790, 1985.

Segner, H. Cytotoxicity assays with fish cells as an alternative to the acute lethality test with fish. *Alternatives to Laboratory Animals*, 32(4), 375-382, 2004.

Schaeffer, W. I. Terminology associated with cell, tissue and organ culture, molecular biology and molecular genetics. *In vitro cellular & developmental biology*, 26, 97-101, 1990.

Schirmer, K., Chan, A. G. J., Greenberg, B. M., Dixon, D. G., Bols, N. C. Methodology for demonstrating and measuring the photocytotoxicity of fluoranthene to fish cells in culture. *Toxicology in vitro*, 11(1-2), 107-119, 1997.

Schirmer, K., Dixon, D. G., Greenberg, B. M., Bols, N. C. Ability of 16 priority PAHs to be directly cytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill. *Toxicology*, 127(1-3), 129-141, 1998a.

Schirmer, K., Chan, A. G. J., Greenberg, B. M., Dixon, D. G., Bols, N. C. Ability of 16 priority PAHs to be photocytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill. *Toxicology*, 127(1-3), 143-155, 1998b.

Schirmer, K. Proposal to improve vertebrate cell cultures to establish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish. *Toxicology*, 224(3), 163-183, 2006.

Schumock, G. T., Li, E. C., Suda, K. J., Matusiak, L. M., Hunkler, R. J., Vermeulen, L. C., Hoffman, J. M. National trends in prescription drug expenditures and projections for 2014. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 71(6), 482-499, 2014.

Schreer, A., Tinson, C., Sherry, J. P., Schirmer, K. Application of Alamar Blue™ Blue blue/5-carboxyfluorescein diacetate acetoxymethyl ester as a noninvasive cell viability assay in primary hepatocytes from rainbow trout. *Analytical biochemistry*, 344(1), 76-85, 2005.

Sies, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American journal of medicine*, 91(3), S31-S38, 1991.

Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E. Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chemické listy*, 93, 229-237, 1999.

Szychowski, K. A., Wnuk, A., Rzemieniec, J., Kajta, M., Leszczyńska, T., Wójtowicz, A. K. Triclosan-evoked neurotoxicity involves NMDAR subunits with the specific role of GluN2A in caspase-3-dependent apoptosis. *Molecular neurobiology*, 56(1), 1-12, 2019.

Tanneberger, K., Knoebel, M., Busser, F. J. M., Sinnige, T. L., Hermens, J. L. M., and Schirmer, K. Predicting fish acute toxicity using a fish gill cell line-based toxicity assay. *Environmental science & technology*, 47, 1110–1119, 2013.

Tartaglia, G. M., Kumar, S., Fornari, C. D., Corti, E., Connelly, S. T. Mouthwashes in the 21st century: a narrative review about active molecules and effectiveness on the periodontal outcomes. *Expert opinion on drug delivery*, 14(8), 973-982, 2017.

Ternes, T. A., Joss, A., Siegrist, H. Peer reviewed: scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment. *Environment Science and Technology*. 392-399, 2004.

Traverso, N., Ricciarelli, R., Nitti, M., Marengo, B., Furfaro, A. L., Pronzato, M. A., Marinari, U. M., Domenicotti, C. Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013.

Ündeğer, Ü., Başaran, A., Degen, G. H., Başaran, N. Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol. *Food and chemical toxicology*, 47(8), 2037-2043, 2009.

U.S. EPA. Prevention, Pesticides and Toxic Substances. [online]. United States: Environmental Protection Agency, 1993. [cit. 26.12.2019]. Dostupné z: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/fs_PC-080402_1-Sep-93.pdf

U.S. EPA. Prevention, Pesticides and Toxic Substances. [online]. United States: Environmental Protection Agency, 1996. [cit. 26.12.2019]. Dostupné z: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/fs_PC-045502_9-Oct-96.pdf

Van Strydonck, D. A., Slot, D. E., Van der Velden, U., Van der Weijden, F. Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis patients: a systematic review. *Journal of clinical periodontology*, 39(11), 1042-1055, 2012.

Waliwitiya, R., Nicholson, R. A., Kennedy, C. J., Lowenberger, C. A. The synergistic effects of insecticidal essential oils and piperonyl butoxide on biotransformational enzyme activities in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 49(3), 614-623, 2012.

Wang, R., Neumann, N. F., Shen, Q., Belosevic, M. Establishment and characterization of a macrophage cell line from the goldfish. *Fish & Shellfish Immunology*, 5, 329–346, 1995.

Wang, F., Xu, R., Zheng, F., Liu, H. Effects of triclosan on acute toxicity, genetic toxicity and oxidative stress in goldfish (*Carassius auratus*). *Experimental animals*, 17-0101, 2017.

Welk, A., Zahedani, M., Beyer, C., Kramer, A., Müller, G. Antibacterial and antiplaque efficacy of a commercially available octenidine-containing mouthrinse. *Clinical oral investigations*, 20(7), 1469-1476, 2016.

Whyte, J. J., Jung, R. E., Schmitt, C. J., Tillitt, D. E. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Critical reviews in toxicology*, 30(4), 347-570, 2000.

Wilder, R. S., Bray, K. S. Improving periodontal outcomes: merging clinical and behavioral science. *Periodontology 2000*, 71(1), 65-81, 2016.

Wolf, K., Mann, J. A. Poikilotherm vertebrate cell lines and viruses: a current listing for fishes. *In Vitro* 16, 168-179, 1980.

Wolf, K., Quimby, M. C. Established eurythermic line of fish cells in vitro. *Science* 135, 1065-1066, 1962.

Wolf, K., Quimby, M. C. Fish cell and tissue culture. In: Hoar WS, Randall DJ (eds) *Fish physiology*, vol III. Academic Press, New York, 253-305, 1966.

Wolf, K., Quimby, C. Primary monolayer culture of fish cells initiated from trypsinized tissues. *TCA Manual 2*, 453-456, 1976.

Yang, Y., Ok, Y. S., Kim, K. H., Kwon, E. E., Tsang, Y. F. Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: A review. *Science of the Total Environment*, 596, 303-320, 2017.

Yeung, S. Y., Huang, C. S., Chan, C. P., Lin, C. P., Lin, H. N., Lee, P. H., Jia, H. W., Huang, S. K., Jeng, J. H., Chang, M. C. Antioxidant and pro-oxidant properties of chlorhexidine and its interaction with calcium hydroxide solutions. *International endodontic journal*, 40(11), 837-844, 2007.